

# アポE-Sendadi とリポタンパク系球体症に関する研究

著者	石垣 泰
学位授与機関	Tohoku University
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/54872">http://hdl.handle.net/10097/54872</a>

アポE-Sendaiと  
リポタンパク系球体症に関する研究

東北大学大学院医学系研究科内科学専攻      石垣   泰



## 要旨

リポタンパク糸球体症 (lipoprotein glomerulopathy ; LPG) は、糸球体毛細血管内にリポタンパク血栓が沈着し、症例の多くがⅢ型高脂血症を呈するなどリポタンパク代謝と関連する新しい型の腎障害である。

LPG患者のアポE遺伝子の解析より明らかにされた145アルギニン→プロリンのアミノ酸置換は、アポE-Sendaiと名づけられ、LPGの原因と考えられている。本研究では、アポE-Sendaiの生化学的性質とLPG発症のメカニズムを明らかにするために、遺伝子工学的手法を用いて各種受容体との親和性を検討し、またアデノウィルスベクター導入によるモデル動物の作製を試みた。

大腸菌ベクターにアポE-SendaiとアポE2, アポE3, アポE4をコードするcDNAを組み込み、組み換えタンパクを発現させた。可溶化、超音波破碎後、カラムクロマトグラフィーをおこない、精製アポEを得た。

精製した4種類の組み換えアポEとDMPCの複合体を作製し、細胞に高発現させたLDLレセプター、VLDLレセプターとDiI標識 $\beta$ -VLDLの結合に対する阻害を解析した。アポE-SendaiはアポE3に比較して、2つのリポタンパクレセプターに対して数分の1の結合能しか持たないこ



とが明らかになった。

アデノウィルスベクターにアポE-SendaiとアポE2, アポE3, アポE4をコードするcDNAを組み込み、組み換えアデノウィルスを作製した。4か月齢のアポEノックアウトマウスに経静脈的に導入し、アポEの分子種による個体レベルの機能の違いを解析した。アデノウィルス感染によるアポEの発現は投与40~60日間持続し、アポEの発現量に応じて血清コレステロール値が低下した。投与4日目の血清コレステロール値は、アポE3発現マウスでは導入前の約20%に低下したが、アポE-SendaiとアポE2の発現マウスでは約50%までしか低下しなかった。HPLC法を用いてリポタンパクプロファイルを解析すると主にVLDL、そしてIDL、LDLの画分のコレステロールが減少し、HDL画分のコレステロールが増加していることがあきらかになった。また、ウィルス投与8週間後に屠殺し、組織学的検索をおこなったところ、胸部大動脈の動脈硬化病変の面積はアポE3、E2、E-Sendaiの順で退縮していた。腎臓においてアポE-Sendai発現マウスにのみ、糸球体毛細血管内にリポタンパク血栓が充満していた。これはヒトリポタンパク糸球体症にきわめてよく類似した所見であった。



今回の研究からアポE-Sendaiは、リポタンパクレセプターへの結合親和性が低く、本症の血清脂質異常の原因であると考えられた。アポE-Sendai発現マウスにのみ、リポタンパク系球体症に類似した系球体病変が認められ、アポEのミスセンス変異がLPGを引き起こしていると考えられた。

### 研究背景

ネフローゼ症候群の病態を呈し、系球体毛細血管内に充満したリポタンパク血栓と呼びうる特異な組織像を示す症例が1987年、Saitoら<sup>1)</sup>により報告された。その後、同様の組織像を示す症例が報告され<sup>2)</sup>、リポタンパク系球体症lipoprotein glomerulopathy(LPG)と名づけられた。いずれの症例もⅢ型高脂血症類似のアポリポタンパク組成異常を呈し、血清アポEが著明に高値であった。等電点電気泳動で確認した表現型はほとんどがE2/3のアイソフォームを有していたが<sup>3)</sup>、RFLPで検討された遺伝子型はE3/3を示しており、その解離が注目された。我々はアポE遺伝子のシーケンス解析にて、G→Cの1塩基置換によって145番目のアミノ酸残基がアルギニンからプロリンにミスセンス変異していることを明らかにした<sup>4)</sup>(Fig.1)。140-150番目のアミノ酸配列はアポEとLDLレセ



プターの結合を担う部位であり<sup>5)</sup>特にプラスの電荷を持つアルギニンとリジンは重要である<sup>6)</sup>。また同部位のアミノ酸変異が連続した $\alpha$ -helix loopのひとつを変形させ、アポEの構造異常を引き起こしていると考えられた。我々は、このアポEの変異がLPGのアポリポタンパク組成異常、腎病変の原因と考え、アポE-Sendaiとして報告した<sup>4)</sup>。最近、LPG症例の解析からアポE-Sendai以外のアポE変異体がいくつか発見されており<sup>7)8)9)</sup>、アポEの異常がLPGの成因であることを強く示唆している。しかし、家系調査によりアポEの変異を有しながらも未発症の例も認められており、アポEの変異とLPGの発症に関しての直接的な証明はなされていない。本疾患は進行性であり、有効な治療法の確立のためにも、腎障害の発症・進展の機序を明らかにすることが重要な課題である。また、このアポE変異体が脂質代謝、ひいては動脈硬化におよぼす影響も不明な点が多く、基礎的な検討が待たれている。

## 研究目的

リポタンパク系球体症患者より同定された変異アポリタンパクE・アポE-Sendaiのリポタンパク代謝における生化学的性質を、リポタンバ



ク・レセプターとの親和性の点で一般的なフェノタイプであるアポE 2、アポE 3、アポE 4と比較し検討する。また、アポE-Sendaiを持つモデル動物を作製し、動脈硬化におよぼす影響とリポタンパク系球体症発症のメカニズムについて検討する。

## 研究方法

特に断わりのない限り一般試薬は半井化学製特級試薬、制限酵素・DNA修飾酵素は宝酒造製を用いた。細胞培養用の試薬はGIBCO BRL社製を用いた。分子生物の一般的方法に関してはMolecular Cloning / Second edition<sup>40)</sup>, Current Protcols in Molecular Biology<sup>41)</sup>, 遺伝子操作の基本手技(東北大学遺伝子実験施設編)<sup>42)</sup>に基づいた。

### [1] 組み換え体アポEの作製と精製

#### (1) アポE-Sendaiを含むgenomic DNAの調整

アポE-Sendaiの変異を持つリポタンパク系球体症患者より、EDTA・2Na存在下に20 ml静脈採血を行なった。氷冷した末梢血に20 ml PBS (-), 200  $\mu$ l 1 M  $MgCl_2$ , 4 ml 10% Triton X-100を加え混合した後、遠心し上清を除去した。10 ml のPBS (-)を加え沈澱を溶解し、10 ml の2



× Proteinase K buffer ( 0.2 M Tris-Cl pH 8.0, 0.1 M NaCl, 20 mM EDTA, 0.4 % SDS ) と200  $\mu$ lのProteinase K (20 mg/ml)を加え、37℃で一晩加温した。その後、フェノール／クロロホルム処理、エタノール沈澱DNAを回収し、TE ( 1 mM Tris-Cl pH 7.5, 0.1 mM EDTA )で溶解した。

## (2) アポE-Sendaiの発現ベクターへの導入

### a) PCRによるアポEの増幅

PCR反応にて患者血液より抽出したgenomicDNAのアポE遺伝子を増幅した。プライマーはアポE-Sendaiの変異部位の5'側のForward primer (GGCACGGCTGTCCAAGGAGC) と3'側のReverse primer(GCACGCGGCCCTGTTCCACC)を用いた。PCR反応は、94℃ 30秒、62℃ 1分、72℃ 2分を1サイクルとして30サイクル反応させ、その後72℃ 15分間反応させた。

### b) アポE-Sendai発現プラスミドの構築

アポE3発現プラスミドpUSFA<sub>2</sub>はShibuiら<sup>10)</sup>によって構築されたプラスミドで、大腸菌の主要シグナル配列であるOmpFとアポE3の融合タンパクがlacリプレッサーと2つのtacプロモーターにより発現される。こ



のベクターを用いると、OmpFの作用によりタンパク質は、大腸菌のペリプラズムに蓄積される。

PCRにて増幅されたDNA断片をAva I とSse8387 I で切断してアポE3発現プラスミドpUSFA<sub>2</sub>のAva I とSse8387 I 部位にサブクローニングし、アポE-Sendai発現プラスミドpUSFAE-Sendaiを構築した。  
(Fig.2)

### (3) 大腸菌におけるタンパク発現と調整

#### a) 大腸菌におけるタンパク発現

アポE-Sendai発現プラスミドを用いて、大腸菌 YK537株<sup>11)</sup>にトランスフォーメーションした。この大腸菌を 50  $\mu$ g/mlアンピシリンを含むLB培地 (1 g glucose, 5 g NaCl, 5 g Bacto-Yeast extract, 10 g Bacto-Tryptone in 1000 ml)で37°C,16時間培養後、1:100の比で新しいLB培地に移し37°Cで培養した。 $A_{600}=1.0$ まで増殖した時点で100mMイソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を培地の1/50量加え、組み換えタンパクの発現を誘導した。27°Cで16時間培養後4°C, 4700 $\times$ g, 20分遠心して集菌し、10 gずつ大腸菌を分注し-80°Cに保存した。



#### b) 大腸菌の破壊

-80°Cに保存した大腸菌10 gをプロテアーゼ阻害剤 (1mM PMSF, 3  $\mu$ g/ml leupeptin, 3  $\mu$ g/ml pepstatin, 5  $\mu$ g/ml aprotinin)を含む、氷冷したurea-phosphate buffer(5 M urea, 2mM sodium phosphate, 1 mg/ml DTT pH7.4) 20 ml に懸濁し、超音波破碎機(トミー精工)を用いて(ダイヤル4,15分)氷中で破壊した。4°C,4700 $\times$ g, 20分遠心後、上清を回収しアポEの精製に用いた。

#### (4) カラムクロマトグラフィー

##### a) ヘパリン・セファロース カラムクロマトグラフィー<sup>12)</sup>

100 mlの膨潤したHeparin Sepharose CL-6B(Pharmacia)を洗浄後、10倍量の urea-phosphate bufferで平衡化した後、直径2.5 $\times$ 20 cmのエコノカラム(Bio Rad)に充填し、カラムクロマトグラフィーに用いた。大腸菌のホモジネートはペリスタポンプを用いて約50 ml/hの流速でヘパリンカラムに吸着させた。ゲルの5倍量の50 mM NaCl,urea-phosphate bufferで洗浄後、50 mM-0.7 Mの NaClのグラディエントにて溶出した。5 mlずつ100本の試験管に溶液を集め、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)と免疫ブロッティングによりアポE



を検出した。アポEを含む画分を100倍量の硫酸アンモニウム buffer( $0.75 \text{ M}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $10\text{mM}$  sodium phosphate pH 7.0)にて1時間×3回透析し、オクチル・セファロース カラムクロマトグラフィーに供した。

#### b) オクチル・セファロース カラムクロマトグラフィー

20 mlの膨潤したOctyl Sepharose 4 Fast Flow(Pharmacia)を洗浄後、10倍量の硫酸アンモニウム bufferで平衡化した。ゲルは直径 $2.5 \times 10 \text{ cm}$ のエコノカラム(Bio Rad)に充填し、ヘパリン・カラムクロマトグラフィーで得たアポE画分を約 $50 \text{ ml/h}$ の流速で吸着させた。ゲルの5倍量の硫酸アンモニウム bufferと同じくゲルの5倍量の $10\text{mM}$  sodium phosphate pH 7.0で洗浄した後、 $0 - 8 \text{ M}$  のUreaのグラディエントにて溶出した。2.5 mlずつ40本の試験管に溶液を集め、同様にアポEを検出した。アポEを含む画分を100倍量の $100 \text{ mM}$   $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ (pH8.0)にて1時間×3回透析し、Aquacide II (Calbiochem)により濃縮し、2mlチューブ(エッペンドルフ)に分注して $-80^\circ\text{C}$ に保存した。

### (5) SDS-PAGEと免疫ブロッティング

#### a) SDS-PAGE



20  $\mu$ l のタンパク溶液を同量の2×sample buffer(100 mM Tris-Cl, 200 mM DTT, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol)と混合し、95℃、5分ボイルした。その後12%ポリアクリルアミドゲルにて50mAの定電流で約60分間電気泳動した。分子量マーカーはSDS-PAGEスタンダードLow Range(Bio Rad)を用いた。泳動後ゲルを約30分間染色液(50% methanol, 10% acetic acid, 0.5 mg/ml Coomassie Brilliant Blue)に浸し、一晚脱染液(30% methanol, 10% acetic acid)にて脱染した。

#### b) 免疫ブロッティング

電気泳動終了後、トランスファーバッファー(48 mM Tris, 39 mM glycine)にゲル、ニトロセルロース・フィルター(Schleicher-Schuell)とワットマン濾紙を浸し、トランスファーバッファーを満たしたトランスブロットセル(Bio Rad)に移して、4℃,15Vで12時間トランスファーを行った。トランスファー終了後、フィルターをブロッキングバッファー(5% skim milk, 0.05% tween20, PBS)に浸し4℃で一晩以上ブロッキングを行った。ブロッキング終了後、フィルターを 5% BSA, 0.05% tween20, PBSに一次抗体として抗ヒトアポE抗体(モノクローナルマウ



スIgG抗体 ; BMLより提供)を $0.4\mu\text{g/ml}$ になるように加え、室温で2時間反応させた。反応終了後フィルターを 0.05% tween20,PBSで10分間、3回の洗浄を行った。次に5% BSA, 0.05% tween20,PBSに二次抗体としてペルオキシダーゼ標識されたウマ抗マウスIgG抗体(VECTOR)を $0.4\mu\text{g/ml}$ になるように加え、室温で1時間反応させた。反応終了後同様に10分間、4回の洗浄を行った。抗体反応を終えた後、ECLplus (Amersham)を用いてフィルターを発光させ、X線フィルム(Kodak)上に10秒から1分感光させた。

## [2] 組み換え体アポEを用いたレセプター結合実験

### (1) DiI標識 $\beta$ -VLDL液の調整

1 %コレステロール・5 %コーンオイルを含むウサギ固形飼料(日本クレア)で2週間以上飼育した日本白色ウサギ(オス)より採血し、血漿を調整した。血漿に25分の1倍量の10 mg/ml DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'- tetramethylindocarbocyanine perchlorate)を含むDMSO (Sigma)を加え、よく攪拌し、フィルター(孔径  $0.8\mu\text{m}$ )で濾過した後、遮光し $37^{\circ}\text{C}$ で10~12時間インキュベートした。等量のSaline-EDTA液(0.85% NaCl, 0.02% EDTA, pH7.4)を加え、超遠心分離機L-8MとType



70Tiローター(いずれもBeckman)を用い60,000rpm, 8℃で16時間遠心分離した。チューブの上面の固形層( $\beta$ -VLDL画分<sup>13)</sup>)をSaline-EDTA液に溶解し、1000倍量のSaline-EDTA液で2時間、3回透析し、DiI標識 $\beta$ -VLDL液とした<sup>14)</sup>。 $\beta$ -VLDL液中のタンパク量は牛血清アルブミン(BSA : BioRad)を標準に用いたLowry法にて定量し、フィルター(孔径 0.45  $\mu$ m)で濾過後4℃で保存し、調整後1週間以内に使用した。

## (2) 組み換え体アポEとDMPCの複合体作製<sup>15)</sup>

dimiristdyl phosphatidyl choline (DMPC : 日本油脂)を10 mg/mlの濃度でTEN buffer(10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, 0.15 M NaCl pH 7.6)に溶解し、室温で30分間放置した。その後、リポソームの粒子径をそろえるために超音波破碎機を用いて(ダイアル4、30分間、37℃)処理し、フィルター(孔径 0.45  $\mu$ m)で濾過後リン脂質B-テストワコーB(和光純薬)にてリン脂質を定量した。精製したアポE2,E3,E4,E-Sendaiを0.1 mg/mlの濃度に調整し、アポEとDMPCの比が1 : 7.5となるようにDMPC溶液を混合した。室温で一晩インキュベートした後、 $d = 1.12$ となるようにKBrで調整し、TLA 100.2Tiローター(Beckman)を用いて100,000rpm, 16℃で3.5時間遠心分離した。上層のリポソームを回収



し、1000倍量のSaline-EDTA液で2時間、3回透析し、Lowry法にてタンパク量を定量した。

### (3) リポタンパクレセプター発現ldlA-7細胞の培養<sup>16)17)</sup>

東北大学遺伝子実験施設のTakahashiらによって、LDLレセプター欠損CHO細胞であるldlA-7細胞にリポタンパクレセプター遺伝子を導入することによって、LDLレセプター、VLDLレセプターを恒常的に高発現する細胞株が樹立された<sup>18)</sup>。これらの細胞を5 % FCSを含む Ham-F12培地にて37℃, 5% CO<sub>2</sub>の条件で培養し、結合実験に用いた。

### (4) DiI- $\beta$ -VLDLの結合に対するDMPC-アポE複合体の競合阻害実験<sup>19)</sup>

約 $1.5 \times 10^5$  cellsのヒトLDLレセプター、ヒトVLDLレセプター発現細胞を、6ウェルのマルチウェルプレート(Becton Dickinson)を用いて、5 % FCSを含む Ham-F12培地で3日間培養した。4℃で30分間プレインキュベーションした後、培地を吸引除去し、氷冷した2 ml PBSと25 mM HEPES(pH 7.4)-DMEMにて細胞を洗浄した。リガンドである0 ~ 20  $\mu\text{g/ml}$  DMPC-アポE複合体と 2.5  $\mu\text{g/ml}$  DiI標識 $\beta$ -VLDLを上記の濃度に25 mM HEPES(pH 7.4)-DMEM 0.5 mlで希釈し、4℃で30



分間プレインキュベーションした後に、マルチウェルプレートに添加し4℃で2時間インキュベートした。インキュベーション終了後、培地を除き、2 mlの氷冷したPBS, 2 mg/ml BSAで細胞を4回、2 mlの氷冷したPBSで2回細胞を洗浄した。0.1 N NaCl, 0.1 % SDS 1 mlを加え、15分間振盪して細胞を溶解し、その一部を用いてタンパク濃度を測定した。また分光蛍光光度計を用いて励起波長 520 nm、蛍光波長 580 nmにて蛍光測定を行い<sup>20)</sup>、細胞表面でのDiI- $\beta$ -VLDLの結合に対するDMPC-アポE複合体の競合阻害を検討した。

### [3] 組み換えアデノウィルスを用いたアポEの発現

アポE-SendaiとLPGの発症の関連性を検討するため、組み換えアデノウィルスとアポEノックアウトマウスを用いてモデル動物の作製を試みた。アポEノックアウトマウスはMaedaらによって作製され<sup>21)22)</sup>、普通食にても強い動脈硬化を呈するため、数多くの研究に利用されている<sup>23)</sup>。このノックアウトマウスに組み換えアデノウィルスを用いてアポEを発現させ、血中コレステロールや動脈硬化病変の変化の解析をおこなった研究は既に報告されており<sup>24)</sup>、この実験系はアポEの生体における影響を観察するのに適していると考えられた。アポE発現組み換えア



デノウィルスはAdenovirus Expression Vector Kit (TaKaRa)を用いて作製した<sup>25)</sup>。

#### (1) コスミドベクターの作製

##### a) アポE遺伝子のアデノウィルスベクターへの導入

ヒトアポE2,E3,E4,E-SendaiのcDNAをマルチプル・クローニング・サイトに挿入されたpUC119(TaKaRa)より、アポE DNAをHindⅢとEcoRⅠで切り出し、T4 DNA polymeraseを用いて末端を平滑化した。アデノウィルスゲノムとCAGプロモーターを有するコスミドベクターpAxCawtのSwaⅠ部位を切断し、アポE DNA断片を挿入した。その後GIGAPACK ⅢGold (Stratagene)を用いてパッケージングを行い、大腸菌LE392株にトランスフォーメーションした。大腸菌よりコスミドDNAを調整し、ClaⅠにてインサートの有無を確認した。コスミドDNAのサイズは40 kbpを超え、インサートの方向を確認するのが困難であったため、コスミドをSalⅠで制限酵素消化し、約6.5 kbpのプラスミドを得た。(Fig.3) このプラスミドを用いて BglⅡとNotⅠの切断パターンとシーケンスにてインサートの方向を確認した。

##### b) コスミドベクターの増殖と精製



インサートが確認されたコスミドを前項と同じくパッケージングし、大量にコスミドを調整した後、CsCl密度勾配超遠心法とフィルターチューブ(Millipore)にて精製した。

## (2) 組み換えアデノウィルスの作製

293細胞は10% FCSを含むDMEM培地にて培養した。精製したコスミドDNA 8  $\mu$ gと制限酵素処理済みDNA-TPC 5  $\mu$ gとを混合し、6 cmディッシュ(FALCON)で培養した293細胞にリン酸カルシウム法でトランスフェクションを行った。翌日、細胞を96ウェルプレート(FALCON)にまきなおした。8日目から10日目に1次ウィルス液を得、24ウェルプレートに培養した293細胞に感染させた。得られた2次ウィルス液からDNAを抽出し、Xho Iの切断パターンで組み換えの確認を行った。さらに25 cm<sup>2</sup> ボトルに培養した293細胞に感染させ3次ウィルス液を、75 cm<sup>2</sup> ボトルに培養した293細胞に感染させ4次ウィルス液を得た。4次ウィルス液を密封型超音波破碎機(トミー精工)を用いて(power5, 30 sec $\times$ 4) 処理した後、himac CR20B3(ヒタチ)にて10,000 rpm, 4°C, 20分間遠心し上清を回収した。次にL7型超遠心機(Beckman)にてS28ローター(25,000 rpm, 4°C, 2 hr)と S41ローター(35,000 rpm, 4°C, 3hr)にて



2回CsCl密度勾配超遠心法を行い、アデノウィルスの濃縮、精製を行った。回収したウィルスを1000倍量のPBS, 10% glycerolに透析し、-80℃に保存した。また96ウェルプレートに培養した293細胞に段階希釈したアデノウィルスを感染させ、Karberの式より50%TissueCulture Infectious Dose(TCID<sub>50</sub>)を計算し、ウィルスの力価を求めた。

### (3) アデノウィルス感染によるアポEの発現<sup>26)</sup>

6 cm<sup>2</sup>ディッシュに培養したCHO細胞、Hep G2細胞、C6細胞に1×10<sup>8</sup> PFUのアデノウィルスを0.5 mlの10% FCS,DMEMで希釈し1時間感染させた。3日間培養し、培地と細胞を回収し免疫ブロッティングにてアポEの発現を検討した。

### (4) アポEノックアウトマウスのアポE欠損の確認と血清脂質の測定

アポEノックアウトマウスはJackson Lab.より購入し、繁殖の後、雄を実験に用いた。飼料には普通餌(CE-2,日本クレア)を用い、自由摂取させた。

マウスの尾の先端約1cmをProteinaseKで処理した後、genomic DNAを抽出し、PCRにてアポEのターゲッティングを確認した。PCR反応は、94℃ 30秒、60℃ 1分、72℃ 2分を1サイクルとして33サイクル



反応させ、その後72℃ 15分間反応させた。プライマーはアポE遺伝子エクソン4内のForward Primer : oIMR182 (GCCGCCCCGACTGCATCT)とネオマイシン耐性遺伝子内のForward Primer: oIMR181 (TGTGACTTGGGAGCTCTGCAGC)、アポE遺伝子エクソン4内のReverse primer : oIMR 180 (GCCTAGCCGAGGGAGAGCCG)を用いた。

マウスの眼窩静脈叢から採血し、調整した血清を用いて免疫ブロッキングを行った。一次抗体はマウスアポEポリクローナルウサギIgG抗体(SANBIO)、二次抗体はペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG抗体(VECTOR)を用いた。また総コレステロール測定にはコレステロールE-テストワコー(和光純薬)を、測定にはLタイプワコーTG・H(和光純薬)を、血糖測定にはグルテストセンサー(三和化学)をそれぞれ用いた。直接採尿をおこない、Protein Assay(Bio Rad)にてタンパク量を定量した。

#### (5) アポEノックアウトマウスへのアデノウィルス感染とアポEの発現<sup>24)</sup>

4ヶ月齢のアポEノックアウトマウスの尾静脈から $2 \times 10^9$  PFUのア



ポE2, アポE3, アポE-Sendaiを組み込んだアデノウィルスを注入した。ネガティブ・コントロールとしてLacZを組み込んだアデノウィルスを使用した。2, 4, 6, 10, 14, 20, 26, 32, 40, 50, 60日目に採血、採尿し、総コレステロール、トリグリセリド、血糖、尿タンパクを測定した。また、ヒトアポEポリクローナルウサギIgG抗体(SANBIO)を用いて免疫ブロッティングとELISAを行い、アポEの発現を検討した。ELISAは96ウェル・プレート(Nunc)を用い、抗体の希釈には1% BSA, 0.05% Tween 20, PBS、洗浄には0.05% Tween 20, PBSを使用した。発色には peroxidase substrate kit : ABTS (VECTOR)を用い、O.D.405を測定した。スタンダードには精製したアポEを用いた。

#### (6) HPLCによるリポタンパクプロファイルの解析<sup>27)28)</sup>

200  $\mu$ lに希釈したマウス血清をサンプルとし、TSK gel Lipopack XL(Tosoh)カラムを接続したHPLCシステム(CCP&8010,Tosoh)にて、リポタンパクプロファイルの解析をおこなった。溶出は0.6 ml/minの流速でTSK溶出液LP-2(Tosoh)にて、次いで0.3 ml/minの流速で酵素液(Determiner L TC and Determiner L TG, Kyowa Medex Co.)にておこなった。カラム溶出液のリポタンパクはO.D.550にて検出した。



## (7) アデノウィルス感染アポEノックアウトマウスの各臓器の組織標

### 本の作製

マウスはアデノウィルス感染後2ヶ月目に頸椎脱臼にて屠殺し、胸部大動脈、腎臓、肝臓、副腎、精巣、脳、肺の各臓器を摘出した。腎臓の一部はカルノア液にて固定し、パラフィンにて包埋した。また一部は急速凍結し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。さらに一部を電子顕微鏡用に2.5% glutaraldehyde-2% paraformaldehyde混合液にて前固定、1% osmium tetroxideを用いて後固定し、脱水した後、Epon 812にて包埋した。カルノア液固定標本は $2\mu\text{m}$ で薄切し、Hematoxylin and Eosin (HE), Periodic acid-Schiff (PAS), Elastica Masson (EM), Azan Malloryの各染色をおこない光学顕微鏡で観察した。凍結標本は $4\mu\text{m}$ で薄切し、OilRed-O染色をおこない脂肪沈着の観察に供したほか、抗ヒトアポEウサギポリクローナルIgG抗体を用い、ペルオキシダーゼ染色による間接酵素抗体法にてアポEの沈着について観察した。電子顕微鏡用標本はウルトラミクロトームにて60~80 nmの超薄切片を作製し、鉛・ウラン二重染色した後、透過型電子顕微鏡 JEM-100 (日本電子社)にて観察した。



その他の臓器は4% PLPで固定した後、4℃で保存の後パラフィンにて包埋した。その後3  $\mu$ mで薄切し、H.E.染色をおこなった。胸部大動脈のH.E.染色標本は心臓起始部より80  $\mu$ m間隔で作製した5枚の切片の動脈硬化病変の面積を、NIH imageを用いてコンピューター画像解析をおこなった。

## 研究結果

(1) 大腸菌で発現させたアポEをHeparinSepharoseとOctyl Sepharoseを用いたカラムクロマトグラフィーにより精製した。Octyl Sepharoseにおいて、塩濃度の低下と尿素の添加の2段階で溶出することで、2種類のカラムにて精製することが可能になった。精製の過程を示すSDS-PAGE(Fig.4)と同様にして精製した4種のアポEのSDS-PAGEと抗アポE抗体による免疫ブロッティングをに示した。(Fig.5)

(2) LDLレセプター発現細胞とDiI- $\beta$ -VLDLの結合に対する精製したアポE2, E3, E4とDMPCの複合体の競合阻害実験を行った。その結果アポE3とE4は濃度依存的にDiI- $\beta$ -VLDLのLDLレセプターへの結合を阻害し、これに対しアポE2ではほとんど阻害がかからず、これらの組み換え型アポEが天然型アポEとほぼ同じ性質を持つことが示された。ア



アポE-SendaiはLDLレセプターに対してはE2とE3のほぼ中間程度の(Fig.6)、VLDLレセプターに対してはE2とほぼ同程度の結合阻害を示した(Fig.7)。結合阻害定数 :  $K_i$  値を計算するとLDLレセプターに対してE3が $0.036(\mu\text{g/ml})$ 、E-Sendaiが $0.128(\mu\text{g/ml})$ であり、VLDLレセプターに対してE3が $0.082(\mu\text{g/ml})$ 、E-Sendaiが $0.136(\mu\text{g/ml})$ であった(Table.1)。いずれのレセプターにおいてもアポE-Sendaiは野生型のアポE3に比べて親和性が低いことが示された。

(3) Saito.らの方法<sup>25)</sup>によりアポEを組み込んだアデノウィルスを作製した。ウィルスの力価は $4 \times 10^9 \sim 2 \times 10^{10}$  PFU/ml程度であった。

精製したアデノウィルスを感染させたCHO細胞、HepG2細胞、C6細胞のいずれの細胞画分においてもアポEの発現を認めた(Fig.8)。哺乳類の細胞においてCAGプロモーター下流の挿入遺伝子が効果的に発現することが確認された。

マウスgenomicDNAをPCR反応にて増幅したところ、wild typeにてアポE遺伝子内のプライマーを用いた場合245 bpのバンドが、またKOマウスにおいてアポE遺伝子内とネオマイシン耐性遺伝子内のプライマーを用いた場合155 bpのバンドが検出され、アポE遺伝子のターゲット



ィングが確認された。またマウスアポEの抗体を用いた免疫ブロッティングにてアポEの欠損を確認した(Fig.9)。

アポEKOマウスに $2 \times 10^9$  PFUアデノウィルスを投与したところ、2日後からアポEの発現を認めた。発現は2~6日目に最大を示し、若干の個体差はあるものの40~60日目までその発現は持続した(Fig.10)。最大にアポEの発現を示した投与4日目の血清にてアポEnのタンパク量をELISAで定量したところ、アポE-Sendai発現マウスで $794 \pm 188$ , アポE2発現マウスで $723 \pm 152$ , アポE3発現マウスで $838 \pm 135$  ( $\mu$ g/ml, mean  $\pm$  S.E.)で各フェノタイプ間で発現量に有意差はなかった(Fig.11)。

組み換えアデノウィルス投与後4日目の総コレステロールの値はLacZ発現マウスで $529 \pm 29$  mg/dl, アポE2発現マウスで $302 \pm 57$  mg/dl, アポE3発現マウスで $89 \pm 11.2$  mg/dl, アポE-Sendai発現マウスで $262 \pm 27$  mg/dl(mean  $\pm$  S.E.)であった。ウィルス投与後4日目のLacZ発現マウスの総コレステロールの値は投与前とほぼ変化なく、アポE2では57%、アポE3では16%、アポE-Sendaiでは49%に低下していた(Fig.12)。同じく投与後4日目のトリグリセリドの値はLacZ発現マウスで $62 \pm 10$  mg/dl,



アポE2発現マウスで $528 \pm 151$  mg/dl, アポE3発現マウスで $84 \pm 8$  mg/dl, アポE-Sendai発現マウスで $460 \pm 130$  mg/dlであった(mean  $\pm$  S.E.M)。 (Fig.13) アポE2とアポE-Sendaiでのみ2~6日目にかけて一過性にトリグリセリドの上昇が認められた。

HPLC法を用いたリポタンパクのプロファイリングの結果、アポEノックアウトマウスのコレステロールはVLDL, IDL, LDL画分がほとんどを占めていた。アポEを発現させることでこれらの画分が減少し、HDL画分が増加していた。LacZ発現群に比べアポE発現群で20min前後のピークが右にずれていることから(21.8 vs 23.0)、VLDL画分の減少が最も著しいと考えられた。以上の変化は、アポE3で最も顕著で、アポE2, アポE-Sendaiでも強くはないが同様であった。また、LacZ発現はパターンに影響を与えなかった(Fig.14)。

腎機能・組織に関して解析したところ、尿タンパク量は0.5~1.2 mg/ml前後で、ウィルス投与前後、また各フェノタイプ間で明らかな差はなかった(Fig.15)。しかし、その凍結標本の解析にてアポE-Sendai発現マウスの腎組織のオイル・レッドO染色において他群に比べ多くの糸球体への脂肪の沈着を認めた(Fig.16)。全糸球体に占める脂肪沈着陽



性糸球体の割合を4群間で比較したところ、アポE-Sendai群では約40%の糸球体が陽性であった(Fig.17)。光学顕微鏡の観察では、糸球体の腫大、毛細管腔の拡大と管腔内に網状の薄染色物の沈着が認められ(Fig.18)、Oil Red-Oにてこの血栓様物質に脂肪が含まれていることが確認された。また、メサングウムから糸球体の血管極にかけての脂肪の取り込みが、アポE2、アポE3、LacZの群より目立って認められた。(Fig.19) アポE免疫染色ではこの血栓様物質の周囲にアポEが認められた。(Fig.20) 電子顕微鏡で観察すると、拡大した毛細管腔内はやや電子密度の高い、細顆粒状の脂肪滴で充満しており、ヒトのリポタンパク糸球体症ときわめて類似した組織像を呈していた(Fig.21.a.)。また他の標本では、毛細管腔内における脂肪滴とともに、泡沫細胞が観察された(Fig.21.b.)。

胸部大動脈標本ではLacZ発現マウスで強い動脈硬化が観察された。アポE3発現マウスでは動脈硬化病変の面積は最も小さく、次いでアポE2、アポE-Sendaiの順であった(Fig.22)。この動脈硬化病変の面積を画像解析にて定量したところ、LacZ発現マウスの動脈硬化病変の面積を100とすると、アポE-Sendai発現マウスで $71.7 \pm 18$  ( $p < 0.05$ )、アポE2



で $63.5 \pm 19$  ( $p < 0.05$ )、アポE3で $36.7 \pm 16$  ( $p < 0.001$ ) (mean  $\pm$  S.E.)であり、いずれのフェノタイプにおいても有意に動脈硬化病変の面積の退縮が認められた。(Fig.23)。

また、肺、肝臓、脳、副腎、精巣のいずれの組織においても、各群の間で特に差を認めず、血栓様物質の沈着も認めなかった。

## 考 察

アポEはVLDLやカイロミクロンレムナント、HDLなどの血漿リポタンパクの主要構成成分で299アミノ酸からなる分子量34 kDaのタンパクであり<sup>29)</sup>、LDL受容体やVLDL受容体、アポE受容体2のリガンドとして、末梢組織への脂質の取り込みや脂質の肝への逆転送に重要な役割をはたしている<sup>30)</sup>。ヒトではアポE2、アポE3、アポE4とよばれる3種類の表現型が存在し、出現頻度の低いE2のホモ接合体は家族性Ⅲ型高脂血症の原因であり<sup>31)</sup>、E4はアルツハイマー病の危険因子である<sup>32)</sup>。アポEには様々な変異体が報告されている<sup>5)</sup>が、ほとんどの例は家族性Ⅲ型高脂血症と関連して論じられており、腎障害との関連が考えられたのはアポE-Sendaiがはじめてである。また同じ145番目のアミノ酸がArgからCys



に置換した変異体が報告されているが腎障害は認められていない<sup>33)</sup>。アポEのアミノ酸配列のなかで140番目から150番目の部位はLDL受容体を認識する重要な配列であることが知られている<sup>5)6)</sup>。この中心の145番目のArg → Proの変異が、近傍の3つ連続した $\alpha$ -helix loopの立体構造に大きな変形をもたらしているであろうと考えられる。したがって、LDL受容体への結合能が低下しており、症例のⅢ型高脂血症類似のリポタンパクプロファイルの異常をもたらしているのではないかと想定される。

今回おこなった、組み換え体アポEを用いたリポタンパク受容体への結合阻害実験では、アポE-Sendaiは野生型のアポE3に比較して、LDL受容体・VLDL受容体の両方に対して、その結合阻害能が数倍低下していることが示された。このことから、LPG患者の血清脂質異常はアポEのLDL受容体認識部位における変異による、リポタンパク受容体への結合能の低下が原因であると考えられた。

また等電点電気泳動にてアポE-SendaiはアポE2とほぼ同じ等電点を持つ<sup>34)</sup>が、結合阻害実験の結果からLDL受容体に対してはアポE2より結合阻害能が高く、VLDL受容体に対してはほぼ同等の結合阻害能を有しており、受容体に対する性質が異なることが示された。しかし、アデノ



ウィルス感染によるアポEの発現実験では、マウスのコレステロール、トリグリセリドの推移、また双方のリポタンパクプロファイルはアポE-SendaiとアポE2はほとんど一致しており、生体内においてはほぼ同様の代謝動態をとることが示唆された。また、マウス胸部大動脈の動脈硬化病変の退縮作用を比較するとアポE3が最も作用が強く、次いでアポE2とアポE-Sendaiの退縮作用はほぼ同等であった。

アポE-SendaiとアポE2を発現したマウスに一過性にトリグリセリドの上昇がみられたが、Tsukamotoらの報告<sup>35)</sup>でも、今回と同様の実験系においてやはりアポE2にのみこのような結果が得られている。急激な大量のアポEの出現が中性脂肪の代謝を抑制するためではないかと、考察されているが、何故アポE-SendaiとアポE2にのみ、このような変化がみられるのかは不明である。

アポE-Sendai発現マウスの腎臓にヒトのLPGと非常に類似した糸球体病変を認めた。光学顕微鏡組織、脂肪染色、電顕所見のいずれもヒトLPG症例の腎組織所見<sup>36)37)38)</sup>と同じ特徴を有していた。このことはアポEの変異がLPGの原因である直接的な証明といえる。

しかし、糸球体症をおこしているマウスの尿タンパク量は他の群のマ



ウスの尿タンパク量と差はなく、ヒトにおいて本症がタンパク尿でもって発見されている状況とは異なっている。ひとつには雄マウスではヒトより大量の尿タンパクを排出しており、このことにより糸球体病変に伴う尿タンパクの増加がマスクされてしまった可能性がある。また糸球体病変が軽度のため、タンパク尿の出現までいたっていないのかもしれない。

脂質代謝異常に関連した腎障害としてはⅢ型高脂血症性腎障害が知られている<sup>39)</sup>。しかし、その組織像はメサングウム領域の多数の泡沫細胞の浸潤が特徴であり、LPGの糸球体の組織像とは明らかに異なる。今回のLPG類似の標本にても、メサングウム領域に泡沫細胞の浸潤を認めるが、これはアポEノックアウトマウス全般にみられる所見であり、高コレステロール血症のもたらす全身性の変化のひとつと考えられる。しかし、LPG発症例の高脂血症の程度も様々であり、またマウスの例を考えてもアポE-Sendaiを発現していることで血清コレステロール値は、発現前よりも確実に低下している。また、肺、肝臓、脳、副腎、精巣の毛細血管にもLPG糸球体にみられるようなりポタンパク血栓は認められず、アポE-Sendaiが腎臓にのみ局所的に作用し、病変をおこしている



と考えられる。糸球体は生体内で唯一、基底膜が露出した部位である。

立体構造が変化したアポE-Sendaiを含むリポタンパクが糸球体に流入し、おそらく変異アポEと基底膜とのインターアクションが変化しているためにリポタンパクが徐々に捉えられ、リポタンパク血栓が形成されるのではないかと想定される。また、糸球体内腔は急激に液体成分の流入と濾過、濃縮がおこなわれる場所であり、このことが糸球体の特異的な病変の形成に寄与しているのかもしれない。

今回のマウスの検討においてもヒトの場合と同様に、アポE-Sendaiを持っていても糸球体病変が出現しない例があり、遺伝的素因の他に何らかの全身的あるいは腎臓局所的要因が関わっていると思われる。しかし、アポE-Sendai群の多くに糸球体への脂肪の沈着を認め、糸球体病変はアポE-Sendaiの発現に伴ってのみみられていることから、変異アポE・アポE-Sendaiが病因と密接に関係していると考えられる。

## 結 論

アポE-SendaiはアポE3に比べてLDL受容体、VLDL受容体への親和性が数倍低いことが明らかになった。



アポEノックアウトマウスに対して、アポE3は強いコレステロール低下作用を示し、アポE-Sendaiの作用は中等度でアポE2と同程度であった。動脈硬化病変の退縮作用はアポE3、アポE2、アポE-Sendaiの順で認められた。

アポE-Sendaiを発現したマウスにのみ、ヒトLPGにきわめて類似した糸球体病変を認め、アポE-Sendaiが特異的な腎障害を引き起こすと考えられた。



## 謝 辞

本研究を発表するにあたり、不勉強な私に分子生化学を基礎から御教授してくださり、素晴らしい実験環境を提供してくださった山本徳男教授に心から感謝申し上げます。

御指導いただきました豊田隆謙教授、下瀬川徹教授、貴重な研究テーマを与えてくださった及川眞一講師はじめ第三内科の諸先生方に深く感謝申し上げます。

また、腎臓組織に関してこの上ない御尽力をいただいた血液浄化療法部斎藤喬雄助教授、数多くの病理標本作製してくださった病理診断学笹野公伸教授、鈴木 貴助手、迅速で正確なりポタンパク分析をしてくださった東京医科歯科大学教養部生化学岡崎三代教授にお礼申し上げます。

最後になりましたが、在学中様々なかたちで力になってくださった藤野貴広助手、金 東浩博士、馬郡健太氏ら東北大学遺伝子実験施設の皆様に感謝いたします。



### 参考文献

- 1) Saito T, Sato H, Kudo K, Oikawa S, Sibata T, Hara Y, Yoshinaga K, and Sakaguchi H : Lipoprotein glomerulopathy: Glomerular lipoprotein thrombi in a patient with hyperlipidemia. Am J Kidney Dis 13 : 148-153(1989)
- 2) Koitabashi Y, Ikoma M, Miyahara T, Fujita R, Mio H, Ishida M, Shimizu K, Sakaguchi H : Long-term follow-up of a pediatric case of lipoprotein glomerulopathy. Pediatr Nephrol 4 : 122-128(1990)
- 3) Oikawa S, Suzuki N, Sakuma E, Saito T, Namai K, Kotake H, Fujii Y, and Toyota T : Abnormal lipoprotein and apolipoprotein pattern in lipoprotein glomerulopathy. Am J Kid Dis 18 : 553-558(1991)
- 4) Oikawa S, Matsunaga A, Saito T, Sato H, Seki T, Hoshi K, Hayasaka K, Kotake H, Midorikawa H, Sekikawa A, Hara S, Abe K, Toyota T, Jingami H, Nakamura H, and Sasaki J : ApolipoproteinE Sendai (Arginine 145→Proline) : A new variant associated with lipoprotein glomerulopathy. J Am Soc Nephrol 8 : 820-823(1997)
- 5) Mahley RW, Weisgraber KH, Innerarity TL, Rall SC : Genetic defects in lipoprotein metabolism : Evaluation of atherogenic lipoproteins caused by impaired catabolism. JAMA 265 : 78-83(1991)
- 6) Wilson C, Wardell MR, Weisgraber KH, Mahley RW, Agard DA : Three-dimensional structure of LDL receptor-binding domain of human apolipoproteinE. Science 252 : 1817-1822(1991)
- 7) Matsunaga A, Sasaki J, Komatsu T, Kanatsu K, Tsuji E, Moriyama K, Koga T, Arakawa K, Oikawa S, Saito T, Kita T, and Doi T : A novel apolipoprotein E mutation, E2 (Arg 25 Cys), in lipoprotein glomerulopathy. Kidney Int 56 : 421-427(1999)
- 8) Ando M, Sasaki J, Hua H, Matsunaga A, Uchida K, Jou K, Oikawa S, Saito T, Nihei H : A novel 18-amino acid



- deletion in apolipoprotein E associated with lipoprotein glomerulopathy. *Kidney Int* 56 : 1317-1323(1999)
- 9) Konishi K, Saruta T, Kuramochi S, Oikawa S, Saito T, Matsunaga A, Sasaki J : Association of a novel 3-amino acid deletion mutation of apolipoprotein E (apo E Tokyo) with lipoprotein glomerulopathy. *Nephron* 83 : 214-218(1999)
  - 10) Sibui T, Uchida-Kanzaki M, Okazaki H, Kondo J, Murayama S, Morimoto Y, Ngahari K and Teranishi Y : High level secretion of human apolipoprotein E produced in *Escherichia coli* : use of a secretion plasmid containing tandemly polymerized omp-F hybrid gene. *J Biotech* 17 : 109-120(1991)
  - 11) Oka T, Sakamoto S, Miyoshi K, Fuwa T, Yoda K, Yamasaki M, Tamura T and Miyake T: Synthesis and secretion of human epidermal growth factor by *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 : 7212-7216 (1985)
  - 12) Suri BS, Targ ME, Robinson DS : The use of heparin sepharose to separate two distinct lipoproteins from the low density lipoprotein fraction of rat plasma. *Atherosclerosis* 53 : 195-205(1984)
  - 13) Kovanen PT, Brown MS, Basu SK, Bilheimer DW, and Goldstein JL : Saturation and suppression of hepatic lipoprotein receptors : a mechanism for the hypercholesterolemia of cholesterol-fed rabbits. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 1396-1400(1981)
  - 14) Pitas RE, Innerarity TL, Mahley RW : Acetoacetylated lipoproteins used to distinguish fibroblasts from macrophages in vitro by fluorescence microscopy. *Arteriosclerosis* 1 : 177-185(1981)
  - 15) Pitas RE, Innerarity TL, Mahley RW : Cell surface receptor binding of phospholipid protein complexes containing different ratios of receptor-active and-inactive E apoprotein. *J Biol Chem* 255 : 5454-5460(1980)
  - 16) Chen CA, Okayama H : High-efficiency transfection of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 7 : 2745-



- 16) Chen CA, Okayama H : High-efficiency transfection of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 7 : 2745-2752(1987)
- 17) Kingsley DM, Krieger M : Receptor-mediated endocytosis of low density lipoprotein : somatic cell mutants define multiple genes required for expression of surface receptor-activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 5454-5458(1984)
- 18) Takahashi S, Kawarabayashi Y, Nakai T, Sakai J, and Yamamoto T : Rabbit very low density receptor ; A low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 9252-9256(1992)
- 19) Goldstein JL, Basu SK, Brown MS : Receptor-mediated endocytosis of low density lipoprotein in cultured cells. *Methods Enzymol* 98 : 241-260(1983)
- 20) Teupser D, Thiery J, Walli AK, Seidel D : Determination of LDL- and scavenger receptor activity in adherent and non-adherent cultured cells with a new single step fluorometric assay. *Biochim et Biophys Acta* 1303 : 193-198(1996)
- 21) Piedrahita JA, Zhang SH, Hagaman JR, Oliver PM and Maeda N : Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 4471-4475(1992)
- 22) Reddick RL, Zhang SH, Maeda N : Atherosclerosis in mice lacking apoE. *Arterioscler Thromb* 14 : 141-147(1994)
- 23) Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N : Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoproteinE. *Science* 258 : 468-471(1992)
- 24) Kashyap V, Santamaria-Fojo S, Brown DR, Parrott CL, Applebaum-Bowden D, Meyn S, Talley G, Paigen B, Maeda N, and Bryan H : Apolipoprotein E deficiency in mice : Gene replacement and prevention of atherosclerosis using adenovirus vectors. *J Clin Invest* 96 :1612-1620(1995)
- 25) Miyake S, Makimura M, Kanegae Y, Harada S, Sato Y, Takamori K, Tokuda C and Saito I : Efficient generation of recombinant adenoviruses using adenovirus DNA-



1324(1996)

- 26) Kanegae Y, Lee G, Sato Y, Tanaka M, Nakai M, Sasaki T, Sugano S and Saito I : Efficient gene activation in mammalian cells by using recombinant adenovirus expressing site-specific Cre recombinase. Nucl Acid Res 23 : 3816-3821(1995)
- 27) Okazaki M, Sasamoto K, Muramatsu T and Hosaki S : Analysis of plasma lipoproteins by gel permeation chromatography. In : Refai N, Warnick GR, Dominiczak MH, eds:Handbook of lipoprotein testing. Washington DC: American Association of Clinical Chemistry Press, 531-548(1998)
- 28) Okazaki M, Komoriya N, Tomoike H, Inoue N, Usui S, Itoh S, Hosaki S, : Quantitative detection method of triglycerides in serum lipoproteins and serum free glycerol by high performance liquid chromatography. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 709 : 179-187(1998)
- 29) Mahley RW : Apolipoprotein E : cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. Science 240 : 622-630 (1988)
- 30) Brown MS, Goldstein JL : A receptor mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science 232 : 34-47(1986)
- 31) Mahley RW, Rall SC Jr : Type III hyperlipidemia (dysbetalipoproteinemia) : the role of apolipoprotein E in normal and abnormal lipoprotein metabolism. In the metabolic and Molecular bases of inherited disease, 7th ed (eds. by Scriver CR ,et al). McGraw-hill, New York, p1953-1980,1995
- 32) Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA : Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. Science 261 : 921-923(1993)
- 33) Lohse P, Rader DJ, Brewer B Jr : Heterozygosity for apolipoprotein E4 Philadelphia (Glu 13→Lys, Arg 145→Cys)



- 33) Lohse P, Rader DJ, Brewer B Jr : Heterozygosity for apolipoprotein E4 Philadelphia (Glu 13→Lys, Arg 145→Cys) is associated with incomplete dominance of type III hyperlipoproteinemia. *J Biol Chem* 267 : 13642-13646(1992)
- 34) Sano R, Abe R, Oikawa S, Fujii Y, Hori S, Suzuki N, Toyota T and Goto Y : Apolipoprotein E phenotypes of normo- and hyperlipidemia in Japanese. *Tohoku J Exp Med* 154 : 297-303(1988)
- 35) Tsukamoto K, Smith P, Glick JM, Rader DJ : Liver-directed gene transfer and prolonged expression of three major human apoE isoforms in apoE-deficient mice. *J Clin Invest* 100 : 107-114(1997)
- 36) Saito T, Sato H, Oikawa S : Lipoprotein glomerulopathy : A new aspect of lipid induced glomerular injury. *Nephrology* 1 : 17-24(1995)
- 37) Churg J, Bernstein J, Glassock RJ : Renal Disease in Classification and Atlas of Glomerular Disease(second edition), Igaku Syoin, New York : 450-475(1995)
- 38) Jennette JC, Olson JL, Schwartz MM, Silva FG : Heptinstall's Pathology of the Kidney(fifth edition), Lippincott, Raven : 1297-1301(1996)
- 39) Amatruda JM, Malgolis S, Hutchins GM : Type III hyperlipoproteinemia with mesangial foam cells in renal glomeruli. *Arch Pathol* 98 : 51-54(1974)
- 40) Sambrook J, Fritz EF & Maniatis T : Molecular Cloning A LABORATORY MANUAL SECOND EDITION (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 11724, 1989)
- 41) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 1987)
- 42) 鈴木裕行 & 山本徳男, GRC版 遺伝子操作の基本手技 (東北大学遺伝子実験施設, 1989)



## Figure Regends

### Fig.1 アポEの構造

- a. アポE遺伝子の構造とアポE-Sendaiの遺伝子変異  
矢印はPCRで用いたprimerの位置
- b. アポEのアミノ酸配列と予想される2次構造  
アポE-Sendai、アポE2、アポE4のアミノ酸置換部位とLDL受容体認識部位を示した。

### Fig.2 アポE発現プラスミドの構造

左はpUC 119 (TaKaRa)にアポEを組み込んだプラスミド。  
右は大腸菌のシグナルペプチド・ompFを持つ発現プラスミド pUSFAE。

### Fig.3 アデノウィルスベクターの構造

アデノウィルスゲノムを含むコスミドベクターpAxCawt。  
CAG promoter下流のSwa I の切断部位にアポEのcDNAを挿入した。Sal I で制限酵素消化後、セルフライゲーションすることで約5.1 kbpのプラスミドを作製した。

### Fig. 4 組み換え体アポEの精製過程

大腸菌で発現させた組み換え体アポE Sendaiを2種類のカラムクロマトグラフィーをおこない精製した。左；分子量マーカー  
レーン1；E.coli extract レーン2；heparin sepharose  
レーン3；octyl sepharose

### Fig. 5 組み換え体アポEの精製過程

大腸菌で発現させた4種類の組み換え体アポEを2種類のカラムクロマトグラフィーをおこない精製した。  
左；SDS-PAGE 右；免疫ブロッティング

### Fig.6 DiI標識- $\beta$ -VLDLとLDL受容体の結合に対するアポE-DMPCの



#### 阻害の検討

LDL受容体発現細胞と $2.5 \mu\text{g/ml}$  DiI標識- $\beta$ -VLDLに $0\sim 20 \mu\text{g/ml}$ の濃度でアポE-DMPCを加えた。 $4^\circ\text{C}$ にて細胞表面におけるアポEの結合阻害を各フェノタイプ間で比較した。  
(mean  $\pm$  S.D.)

Fig.7 DiI標識- $\beta$ -VLDLとVLDL受容体の結合に対するアポE-DMPCの阻害の検討

Fig.5と同様にして、VLDL受容体とアポEの結合阻害を検討した。(mean  $\pm$  S.D.)

Fig.8 アデノウィルス感染による哺乳類細胞におけるアポEの発現

左：CHO細胞での各種アポE発現の細胞画分と培地での検討  
中：HepG2細胞でのアポE-Sendai発現の時間経過  
右：C6細胞での各種アポEの発現

Fig.9 アポEノックアウトマウスの解析

a. マウスゲノムDNAのPCRによる解析

左レーン：ワイルドタイプ    右レーン：ノックアウト  
スタンダードマーカースは $\lambda$  HindIIIを用いた。

b. 抗マウスアポE抗体による免疫ブロッティング

Fig.10 アデノウィルス感染によるアポE発現の時間経過

アポEノックアウトマウスにおけるアポEの発現を、投与前から投与60日後まで免疫ブロッティングにて確認した。一次抗体は抗ヒトアポEポリクローナル抗体をもちいた。

Fig.11 アデノウィルス投与4日後のアポE発現の定量

アデノウィルス投与4日後のマウス血清を用いて、アポEのタンパク量をELISAにて定量した。(mean  $\pm$  S.E.)

Fig.12 アポE発現に伴う血清コレステロールの変化

アポEノックアウトマウスにおける血清コレステロール値の変化をアデノウィルス投与前から20日目まで経時的に示した。  
(mean  $\pm$  S.E.)



Fig.13 アポE発現に伴う血清トリグリセリドの変化

アポEノックアウトマウスにおける血清トリグリセリド値の変化を  
アデノウィルス投与前から20日目まで経時的に示した。

(mean±S.E.)

Fig.14 アデノウィルス投与4日後のマウス血清リポタンパク

プロファイル

アデノウィルス投与4日後のマウス血清を用いて、リポタンパク  
プロファイルをHPLC法にて検討した。実線がコレステロール、  
破線がトリグリセリドの溶出パターン。

Fig.15 アデノウィルス投与後の尿タンパク量の推移

アポEノックアウトマウスにおける尿タンパク量の変化をアデノウ  
ィルス投与前から50日目まで経時的に示した。(mean±S.E.)

Fig.16 マウス腎組織のOil Red-O染色像

弱拡大(50倍)にて比較した。

右;アポE-Sendai                      左; LacZ

Fig.17 全マウス糸球体に占めるOil Red-O陽性糸球体の比率

(mean±S.E.)

Fig.18 マウス腎組織の光学顕微鏡所見

アポE-Sendai発現アポEノックアウトマウスの糸球体をAzan-  
Mallory染色にて200倍で観察した。

Fig.19 脂肪染色によるマウス腎組織の光学顕微鏡所見

アポE-Sendai発現アポEノックアウトマウスの糸球体をSudan染  
色にて200倍で観察した。

Fig.20 免疫染色によるマウス腎組織の光学顕微鏡所見

アポE-Sendai発現アポEノックアウトマウスの糸球体を抗ヒトア  
ポE抗体にて免疫染色をおこない200倍で観察した。

Fig.21 マウス腎組織の電子顕微鏡所見



アポE-Sendai発現アポEノックアウトマウスの糸球体を電子顕微鏡にて観察した。a. 8000倍 b. 5000倍

Fig.22 マウス胸部大動脈の光学顕微鏡所見

アポEノックアウトマウスの胸部大動脈の起始部の横断像をH.E.染色にて観察した。

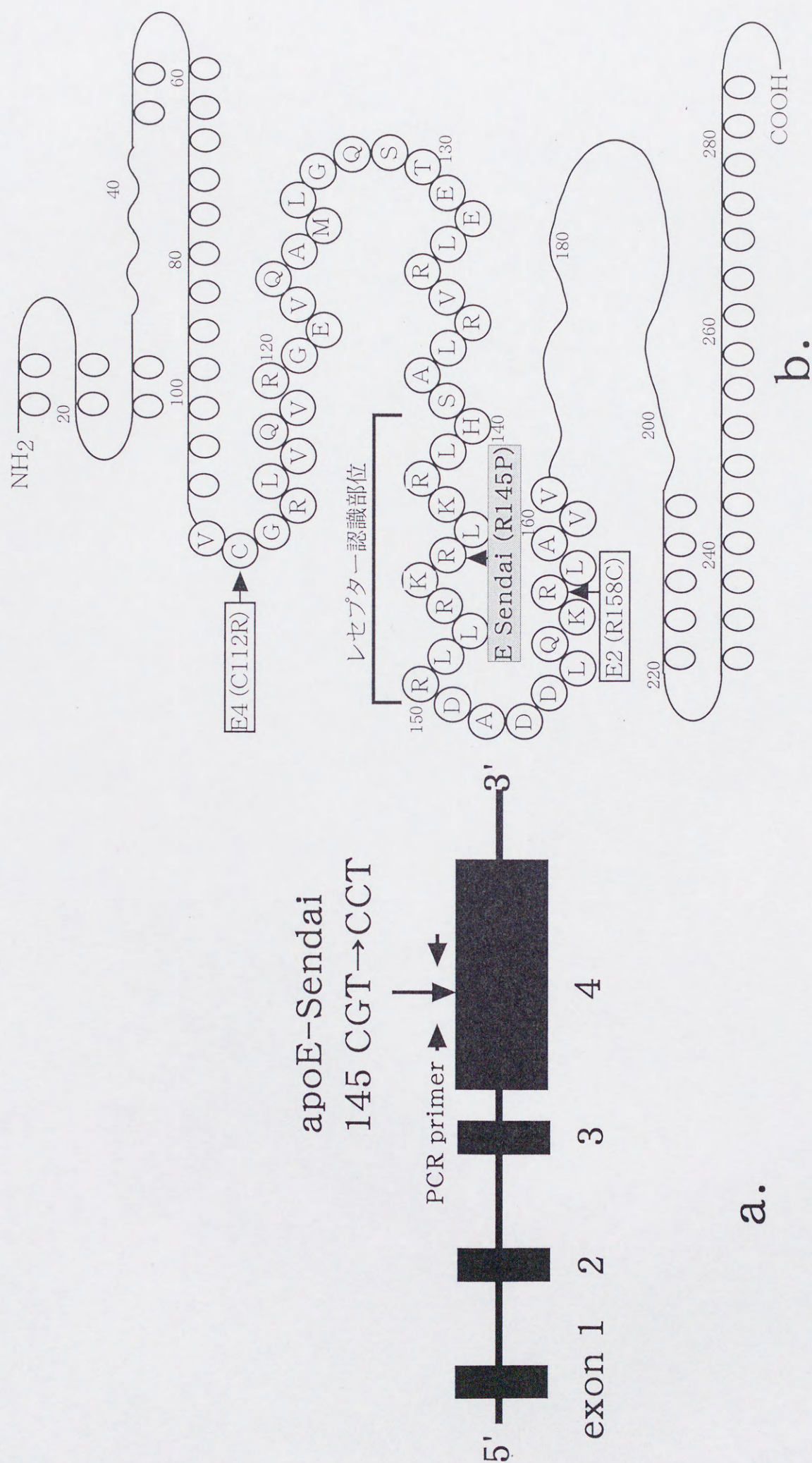
Fig.23 マウス胸部大動脈の動脈硬化病変の比較

アデノウィルス投与2ヶ月後の胸部大動脈の動脈硬化病変の面積をNIHImageを用いて定量した。アポE3( $p < 0.001$ )、アポE2( $p < 0.05$ )、アポE-Sendai( $p < 0.05$ )でいずれの群でも有意な退縮が認められた。(mean  $\pm$  S.E.)

Table.1 アポEのリポタンパク受容体に対する結合阻害定数

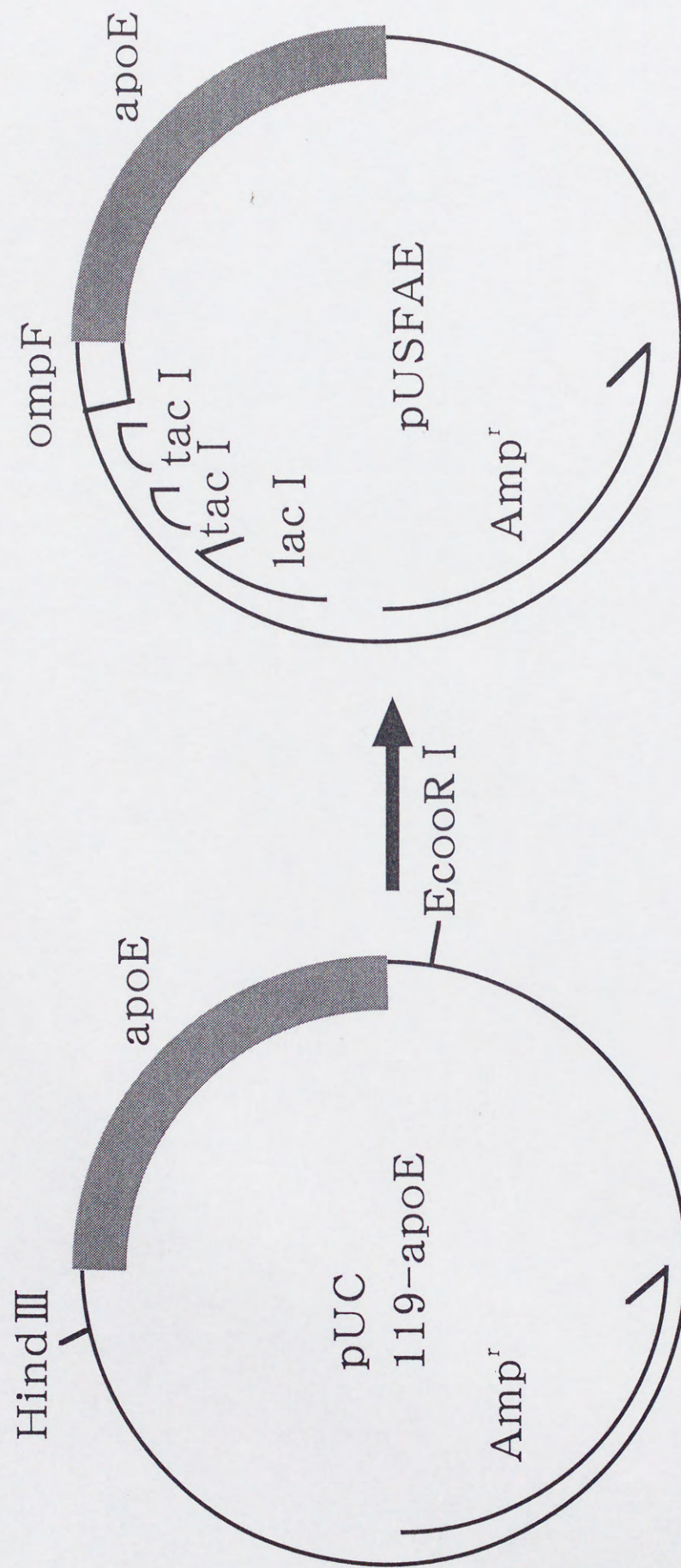
LDL受容体とVLDL受容体に対する $\beta$ -VLDLの結合におけるアポE3とアポE-Sendaiの結合阻害定数を解析した。





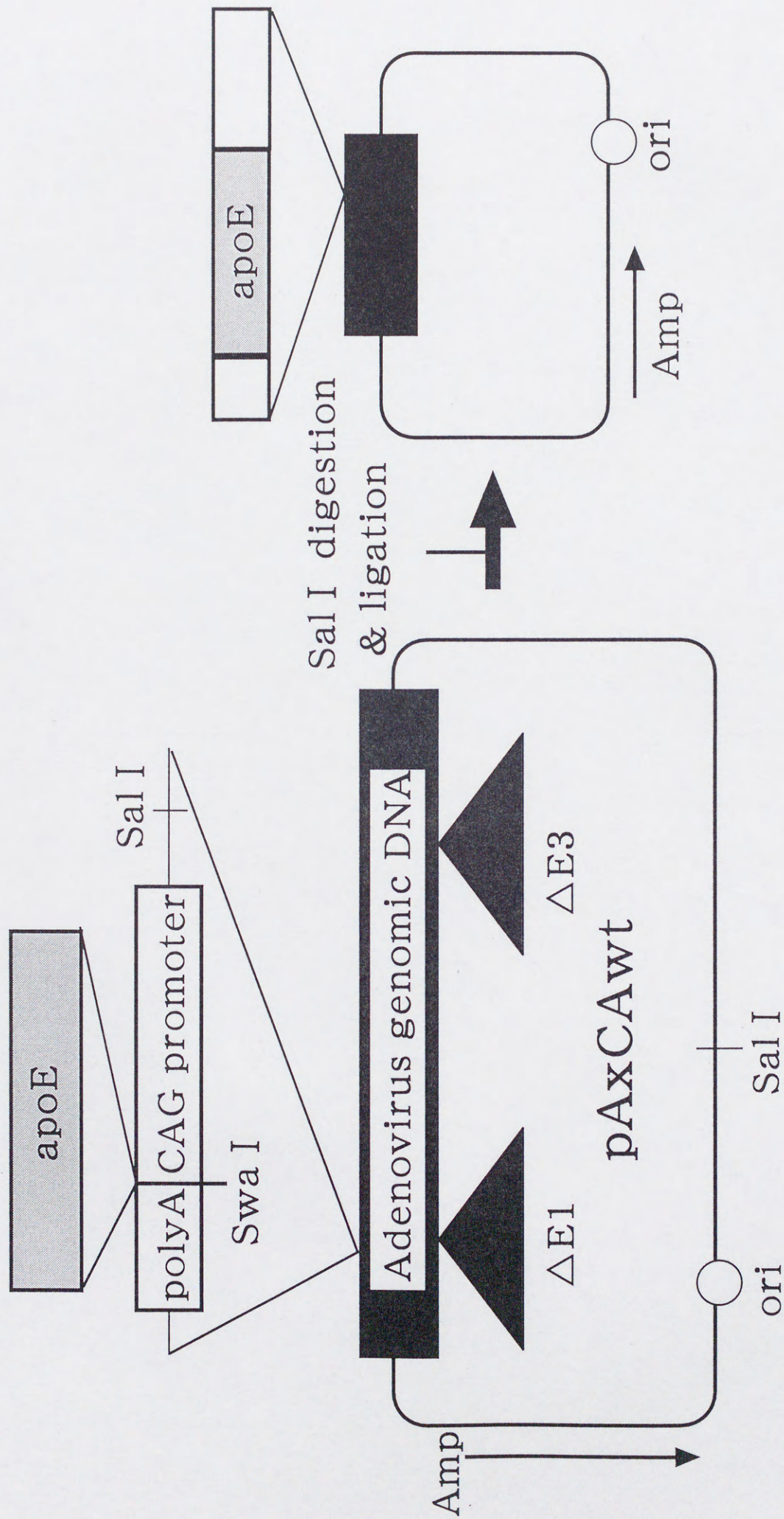
**Fig.1 Construction of apolipoproteinE**





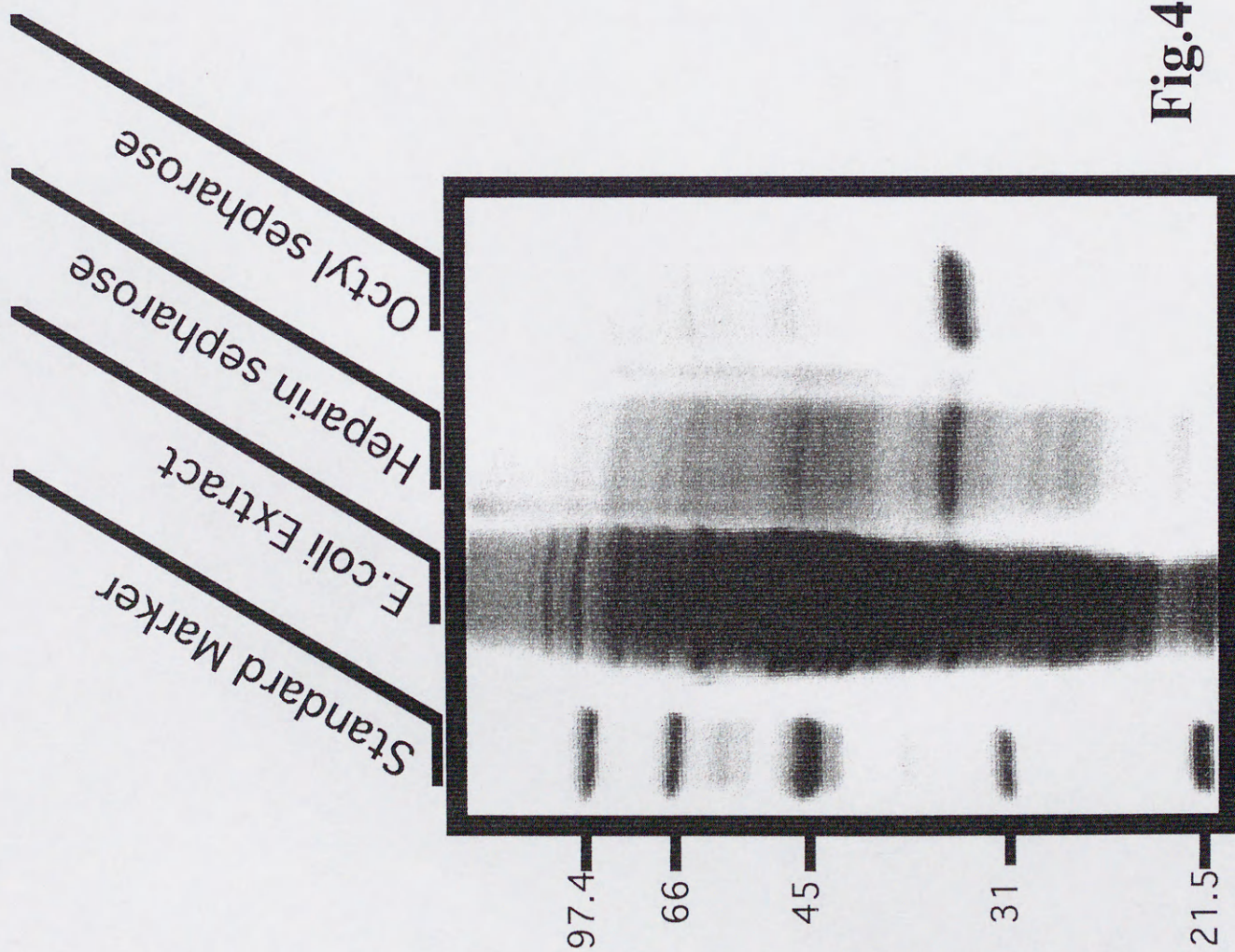
**Fig. 2 Construction of apoE expression vector**





**Fig.3 Construction of adenovirus vector**





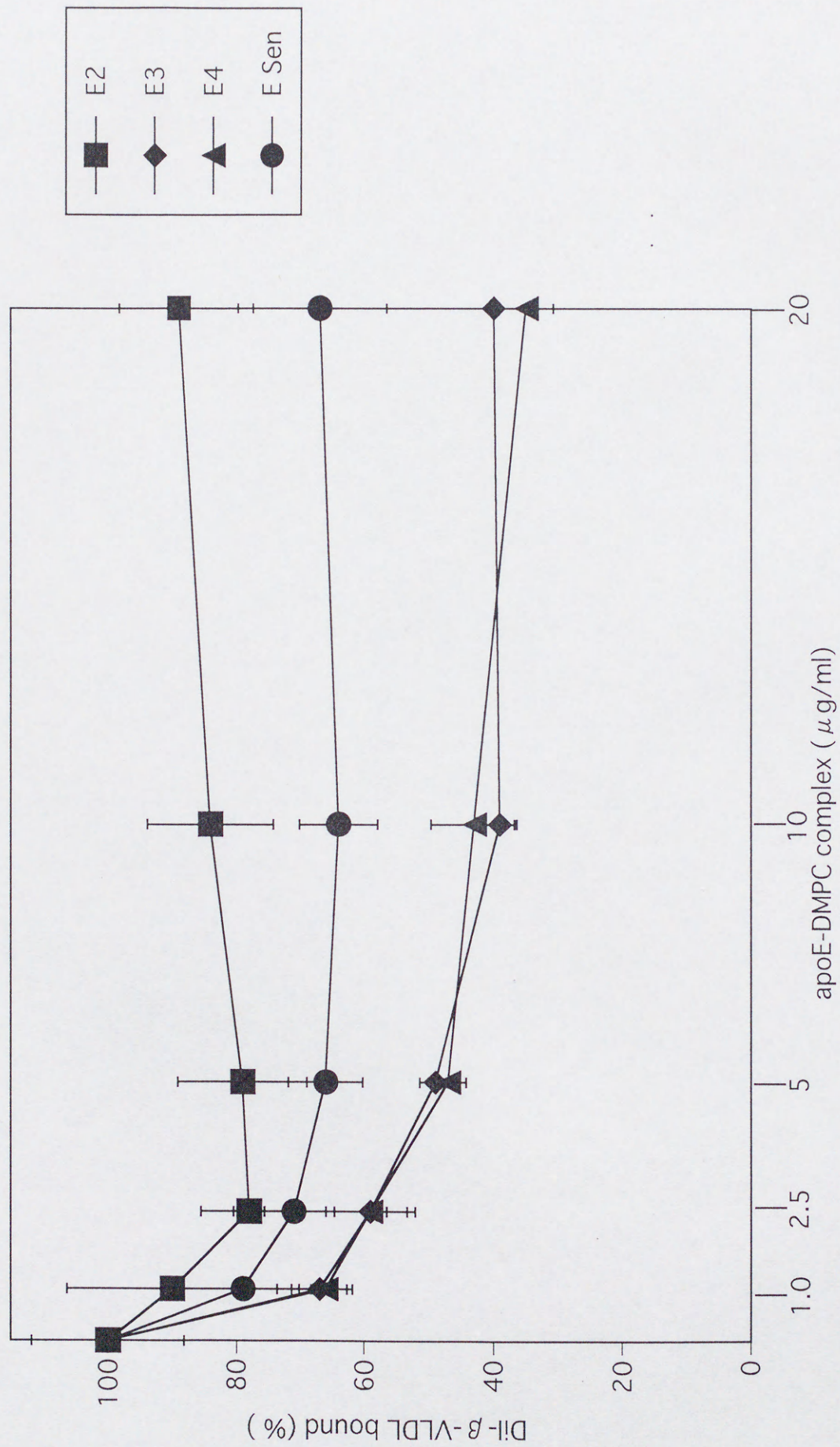
**Fig.4 Step purification of apoE-Sendai**





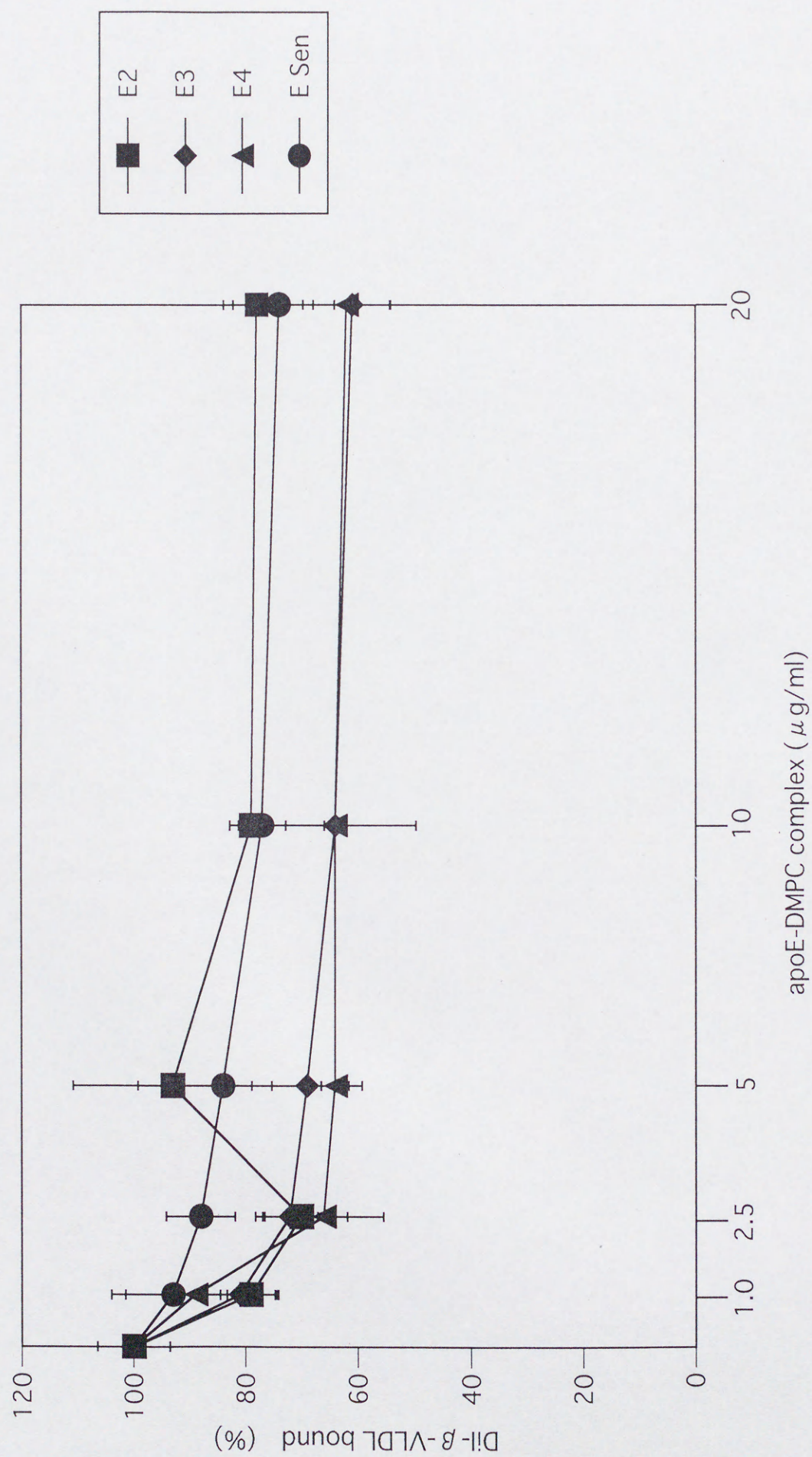
Fig.5 Purification of recombinant apoEs





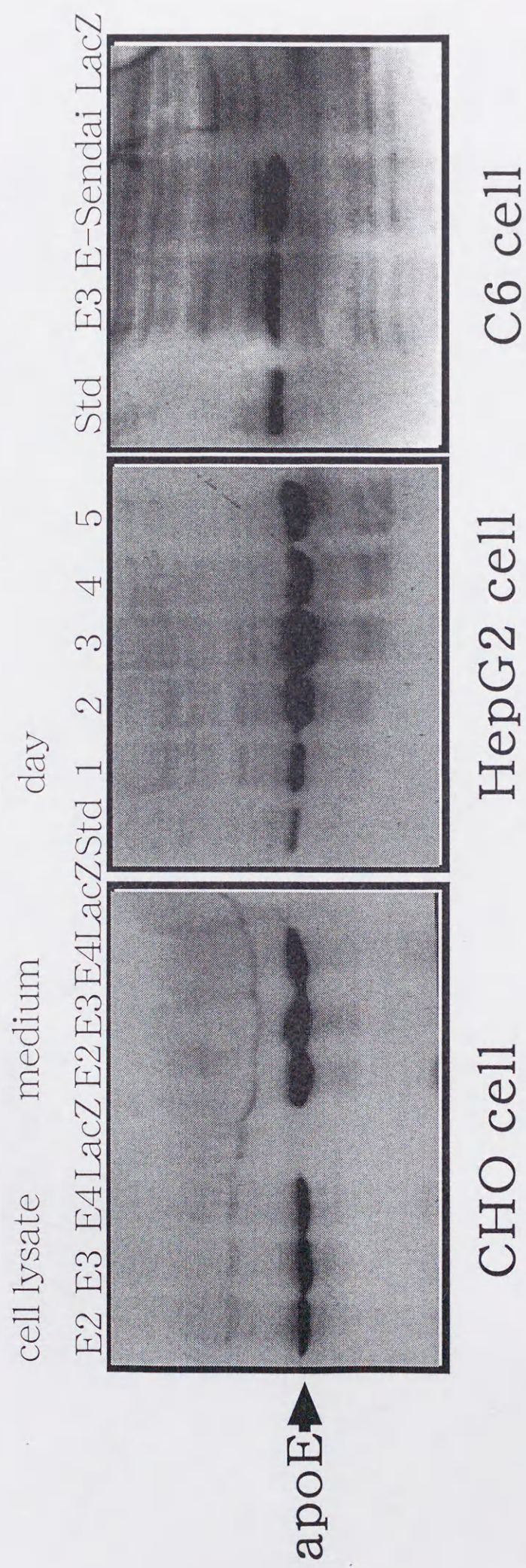
**Fig.6 Effects of apoE-DMPC complex on binding of DiI-β -VLDL to LDLR transfected cells**





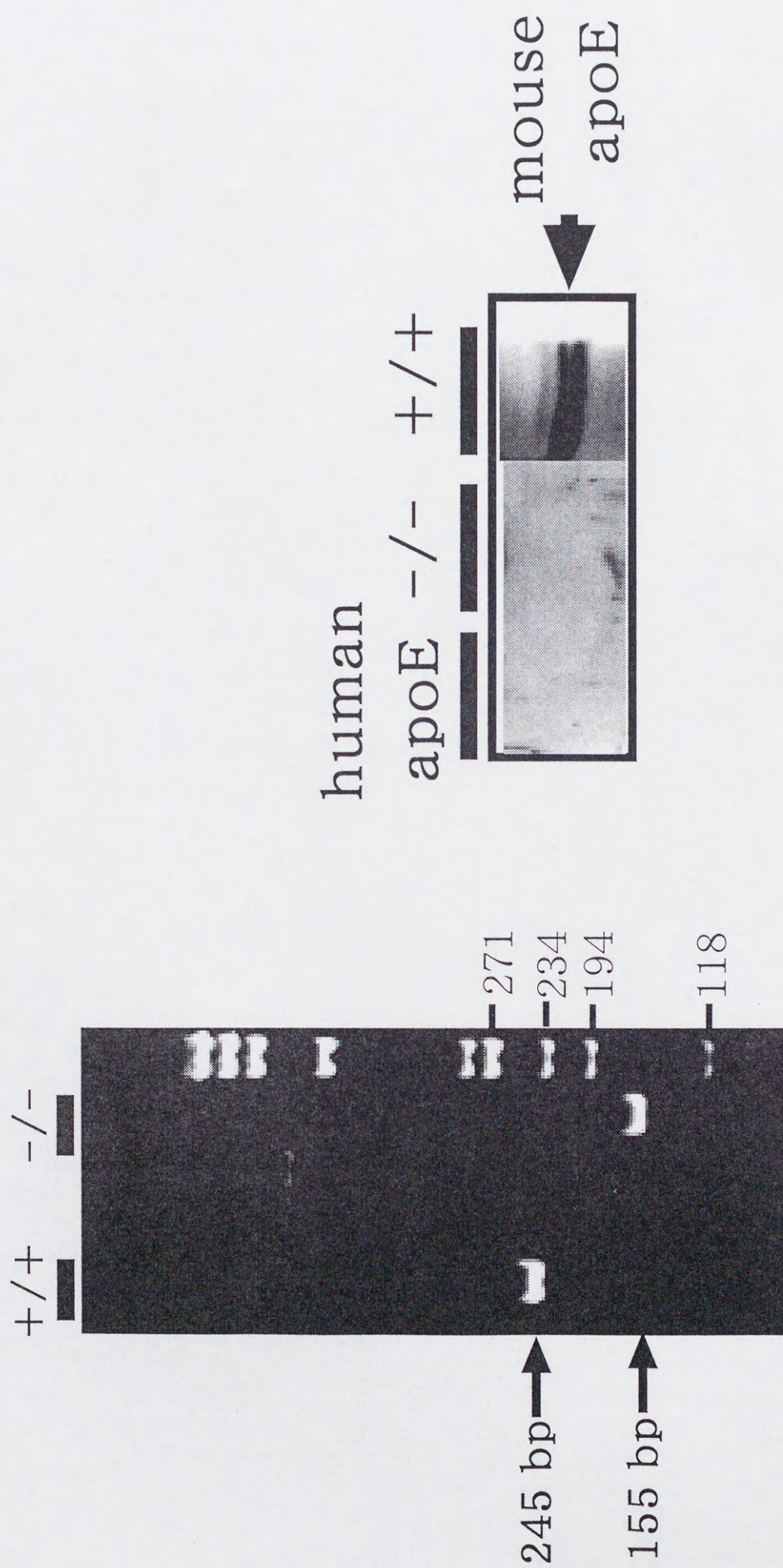
**Fig.7 Effects of apoE-DMPC complex on binding of DiI- $\beta$ -VLDL to VLDLR transfected cells**





**Fig.8 Expression of apoE after adenoviral infection**





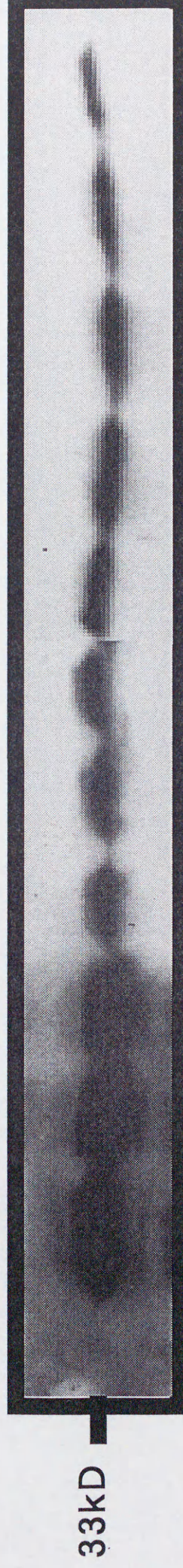
a. PCR b. Immunoblotting

Fig.9 Analysis of apoE KO mice



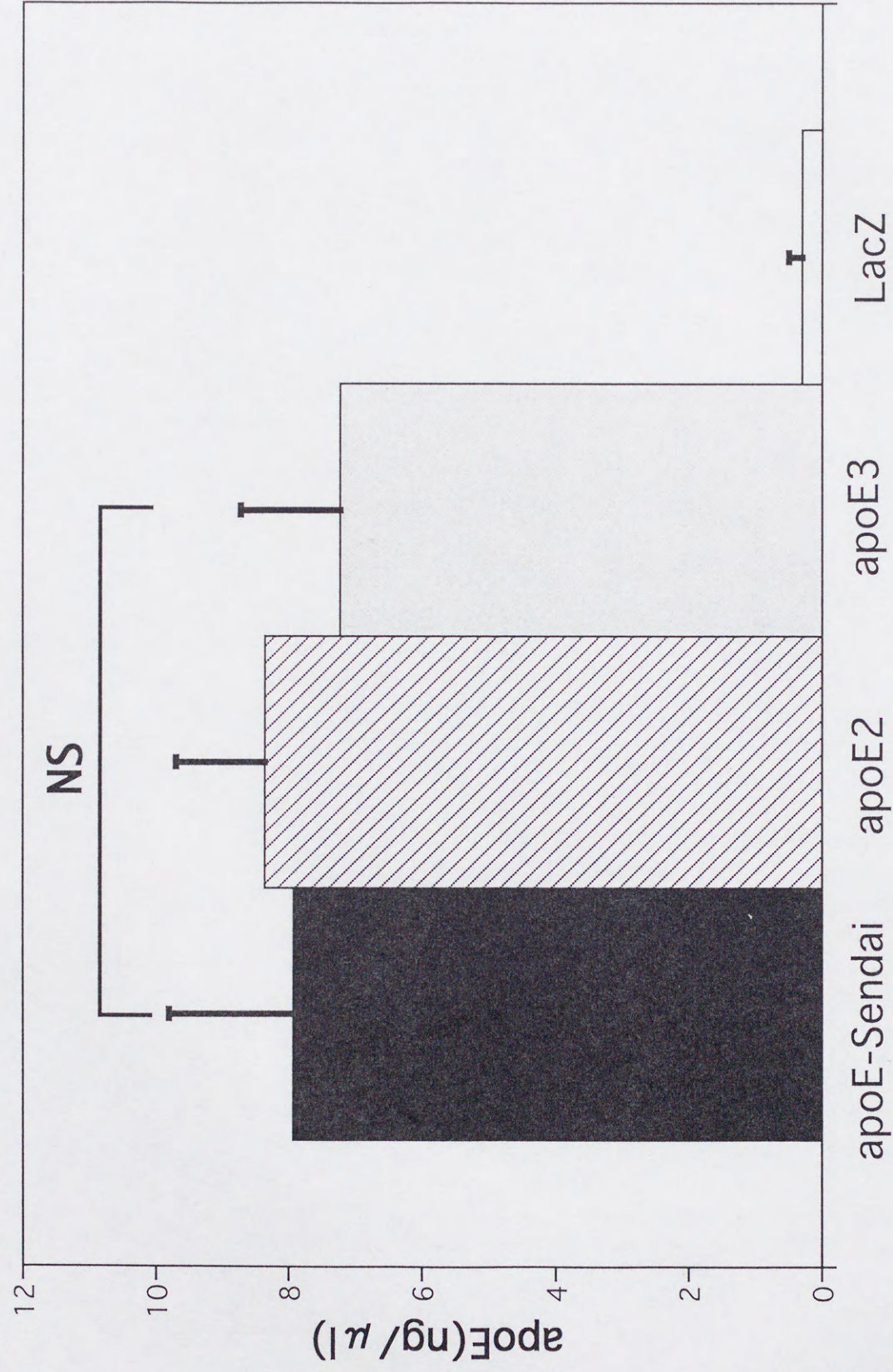
days after infusion

0 2 4 6 10 14 20 26 32 40 50 60



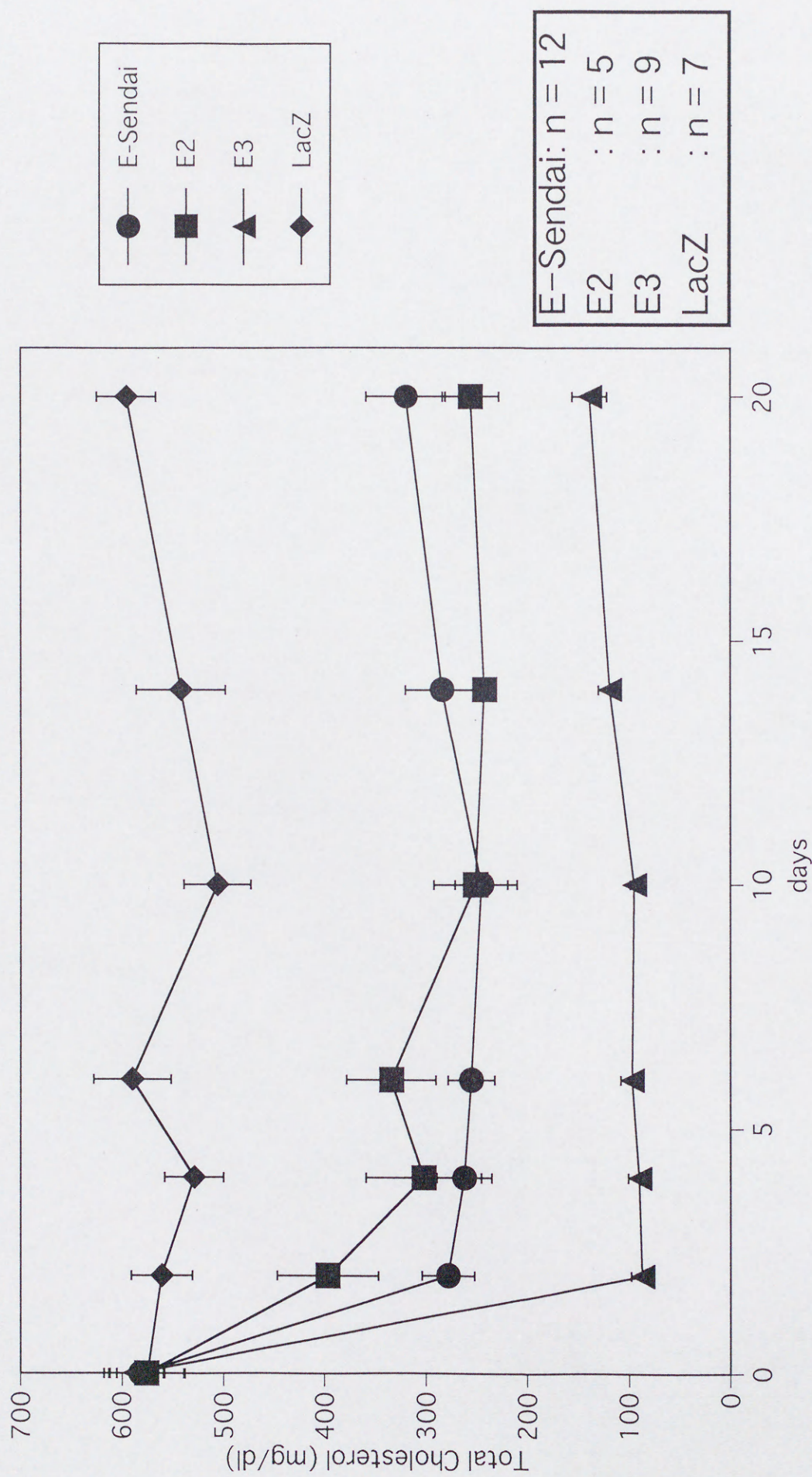
**Fig.10 Western blotting of apoE levels in plasma of apoE KO mice after adenoviral infusion**





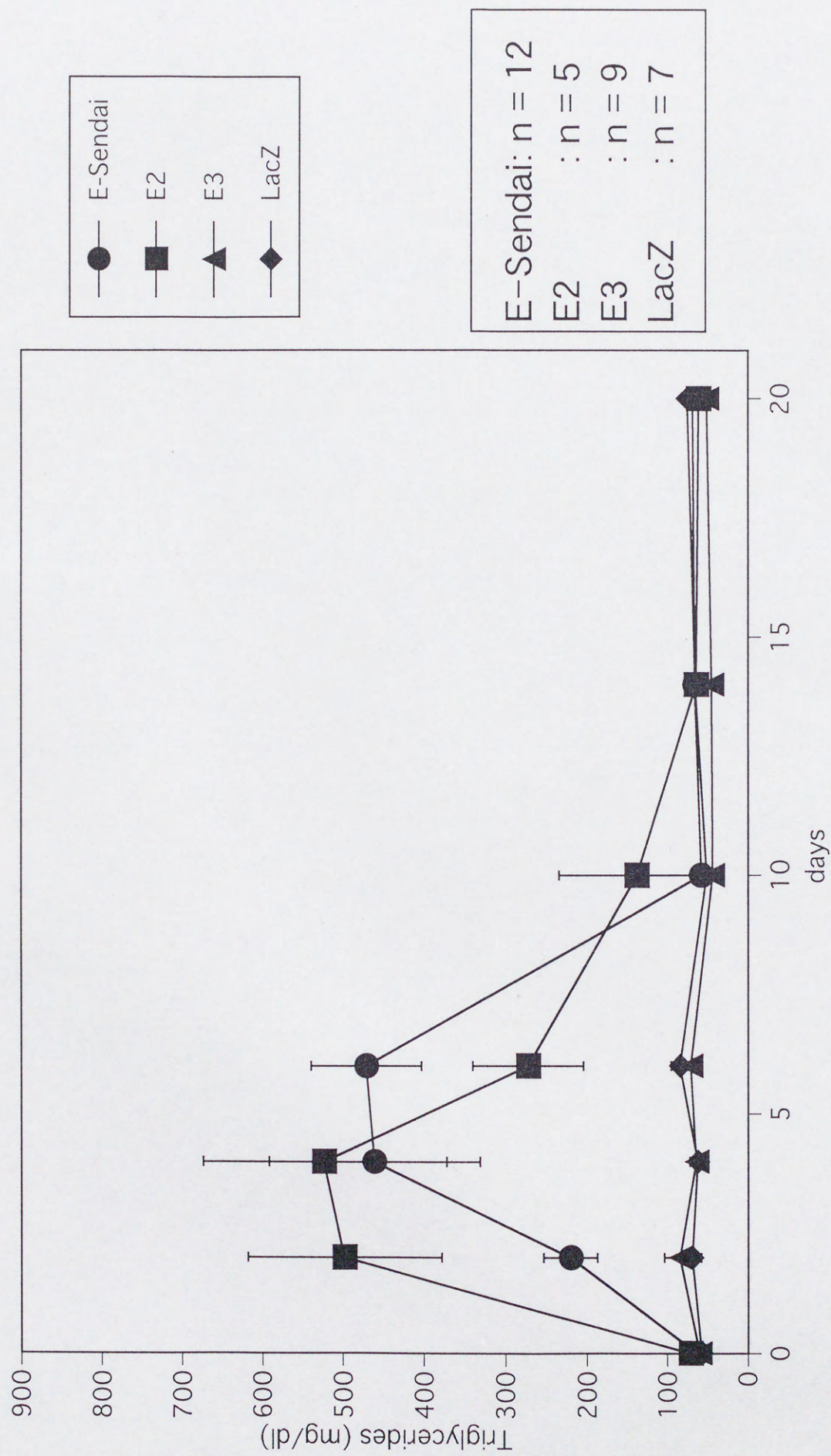
**Fig.11 Quantitation of human apoE of apoE KO mice 4days after adenoviral infusion**





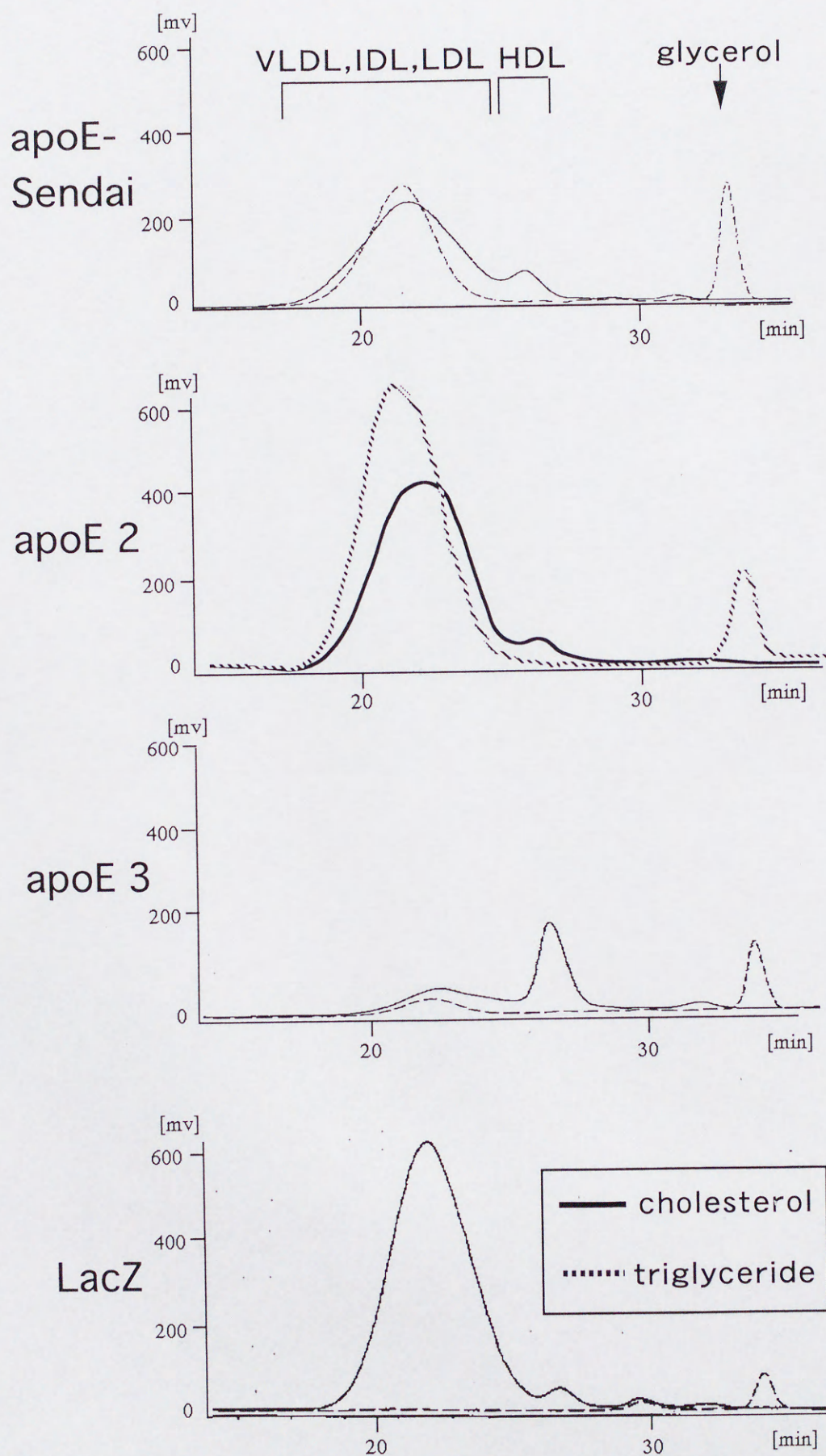
**Fig.12 Plasma cholesterol values after adenoviral infusion**





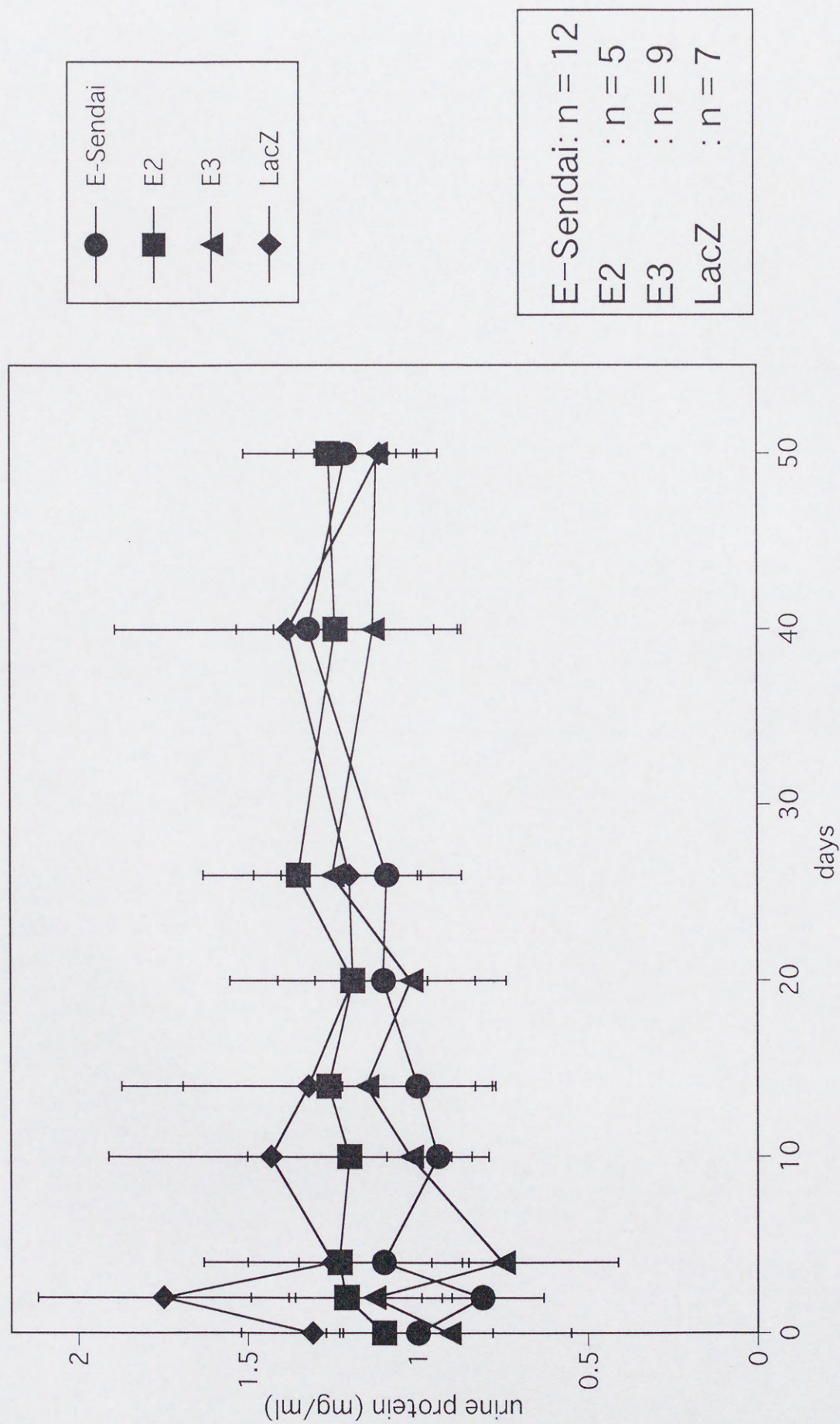
**Fig.13 Plasma triglycerides values after adenoviral infusion**





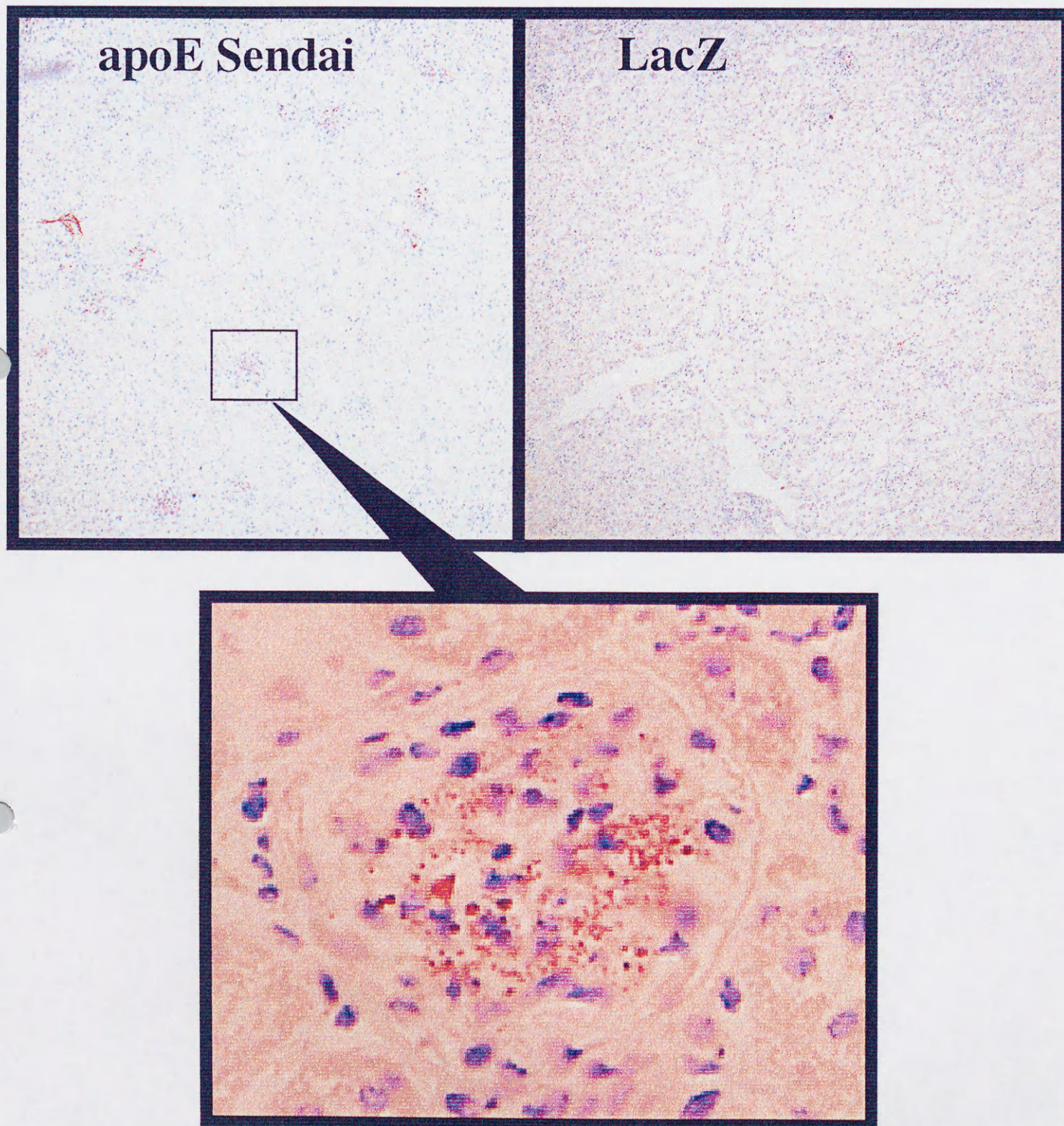
**Fig.14 Lipoprotein profile of apoE KO mice 4days after adenoviral infusion**





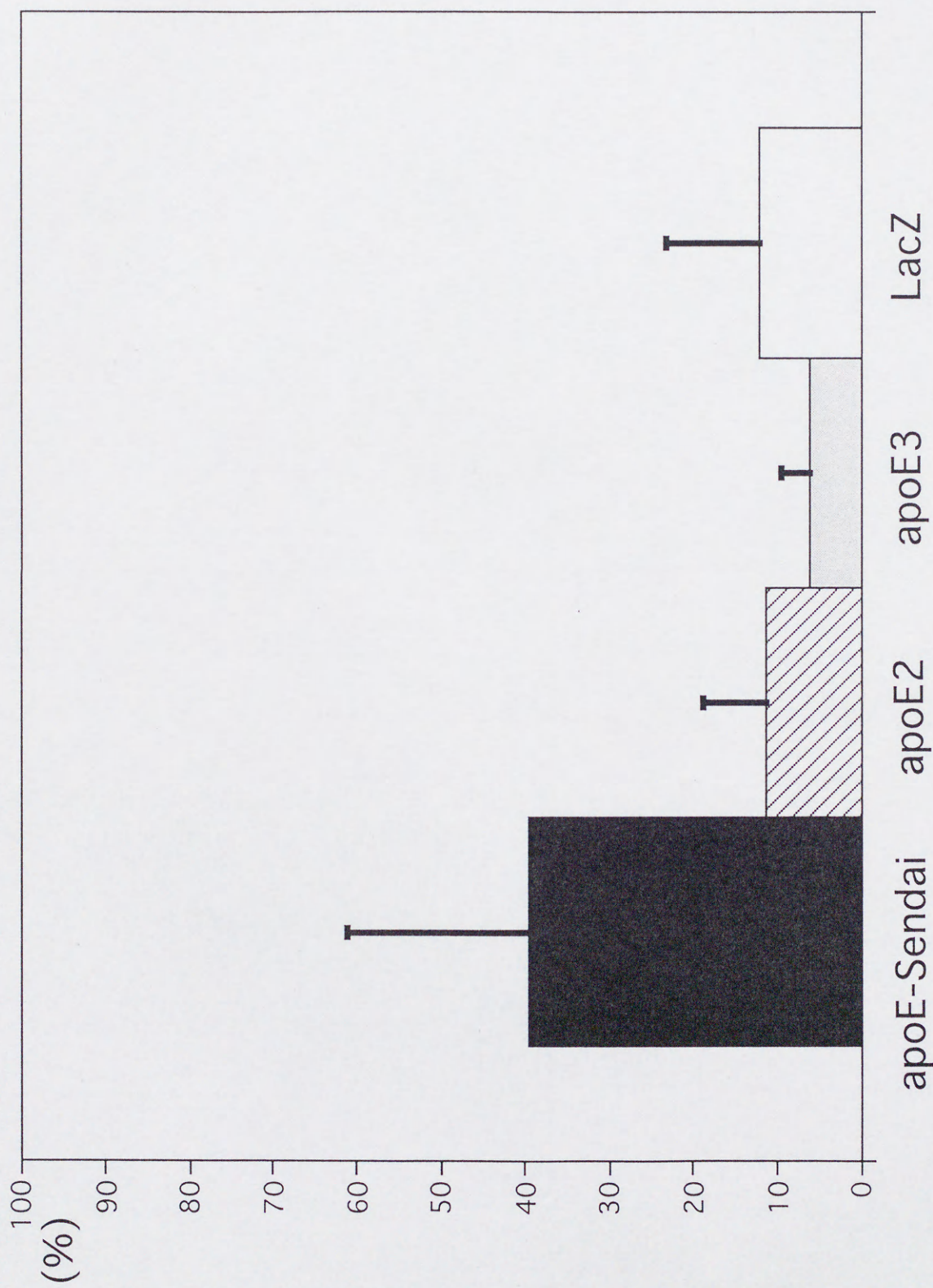
**Fig.15 Urine protein values after adenoviral infusion**





**Fig.16 Light microscopy of glomerulus  
with oil red-0 stain.**



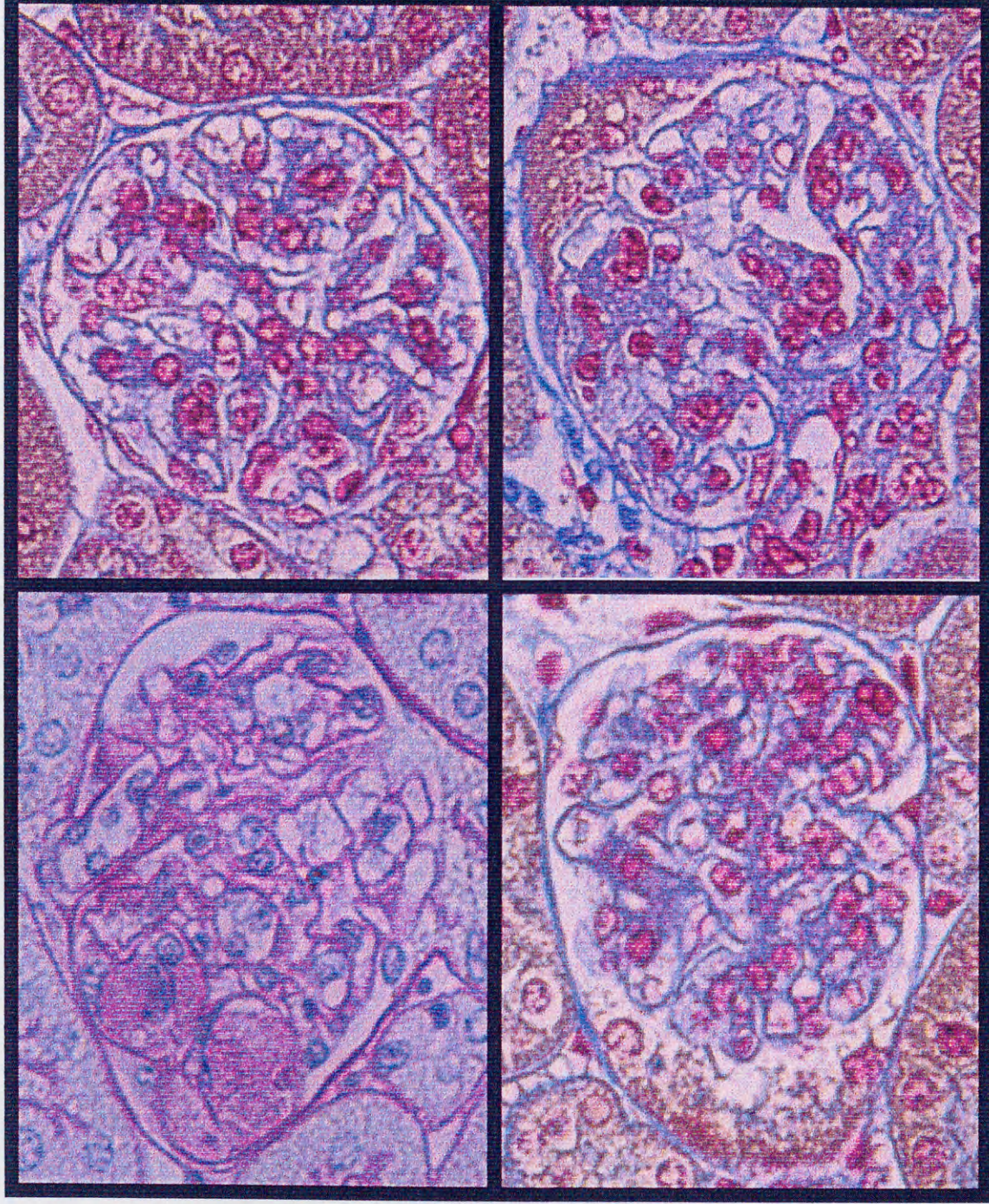


**Fig.17 Counts of Oil Red O positive glomerulus in light microscopy**



**apoE-  
Sendai**

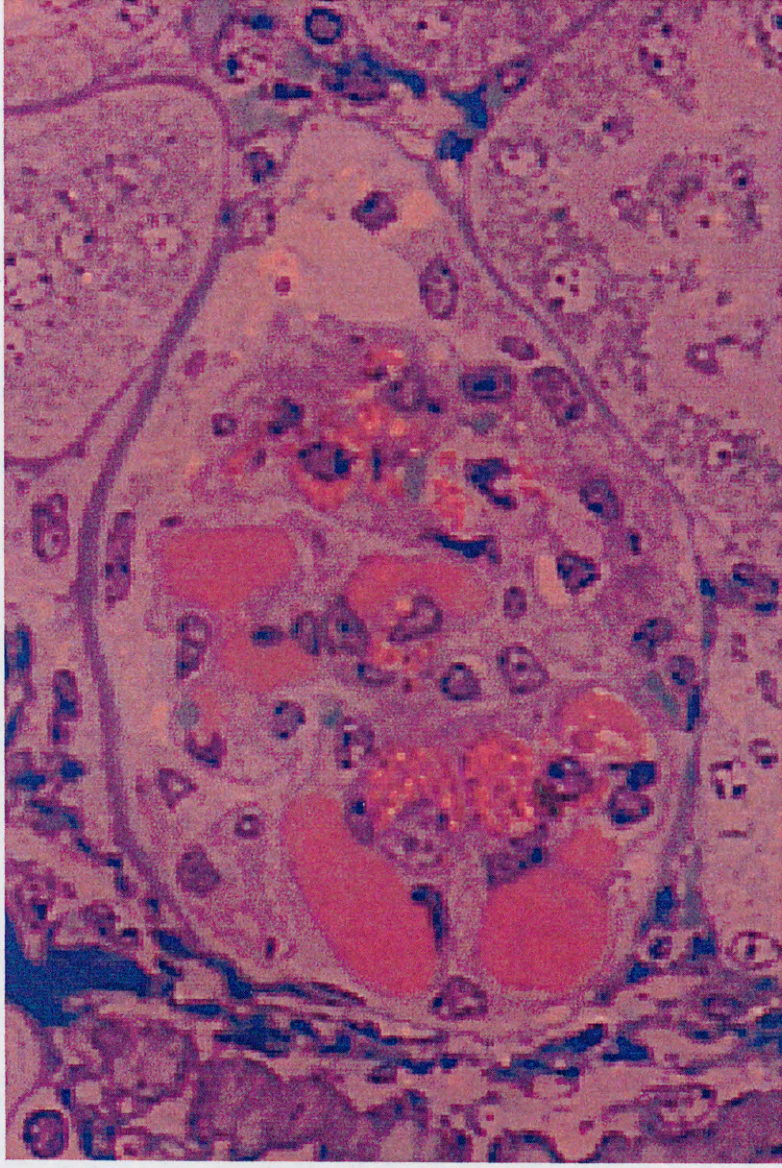
**apoE2**



**LacZ**

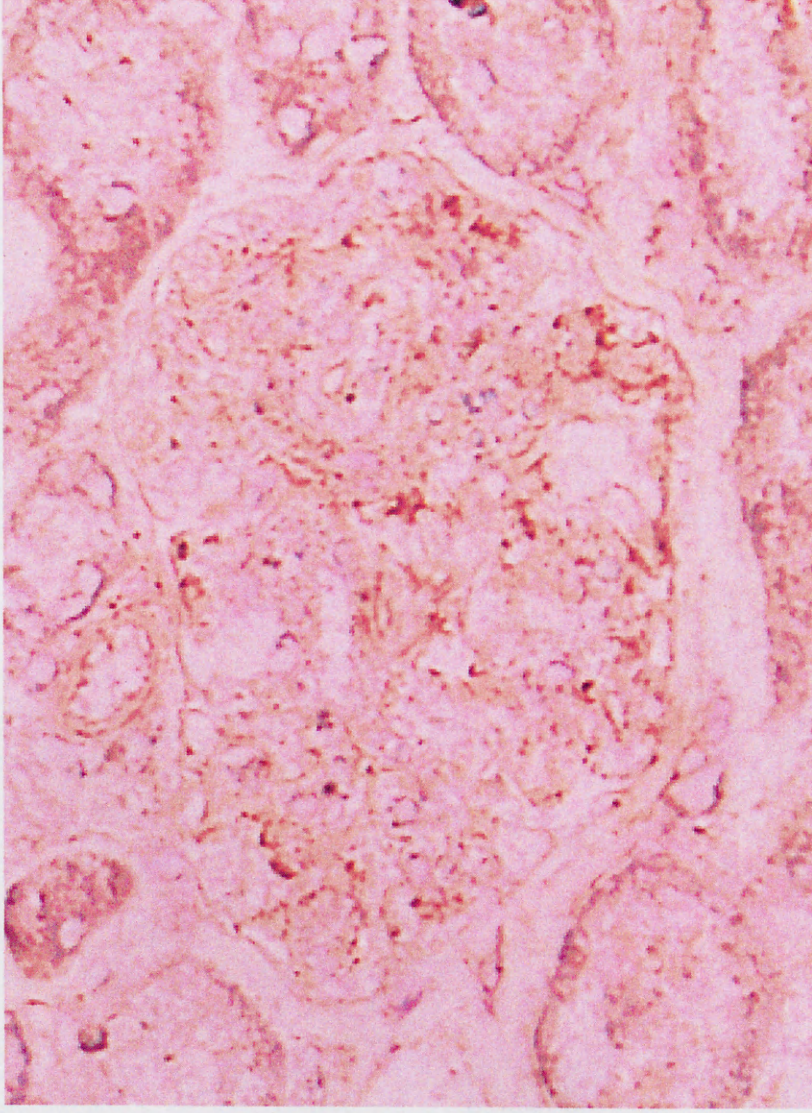
**Fig.18 Light microscopy of glomerulus  
with Azan Mallory stain magnification 200**





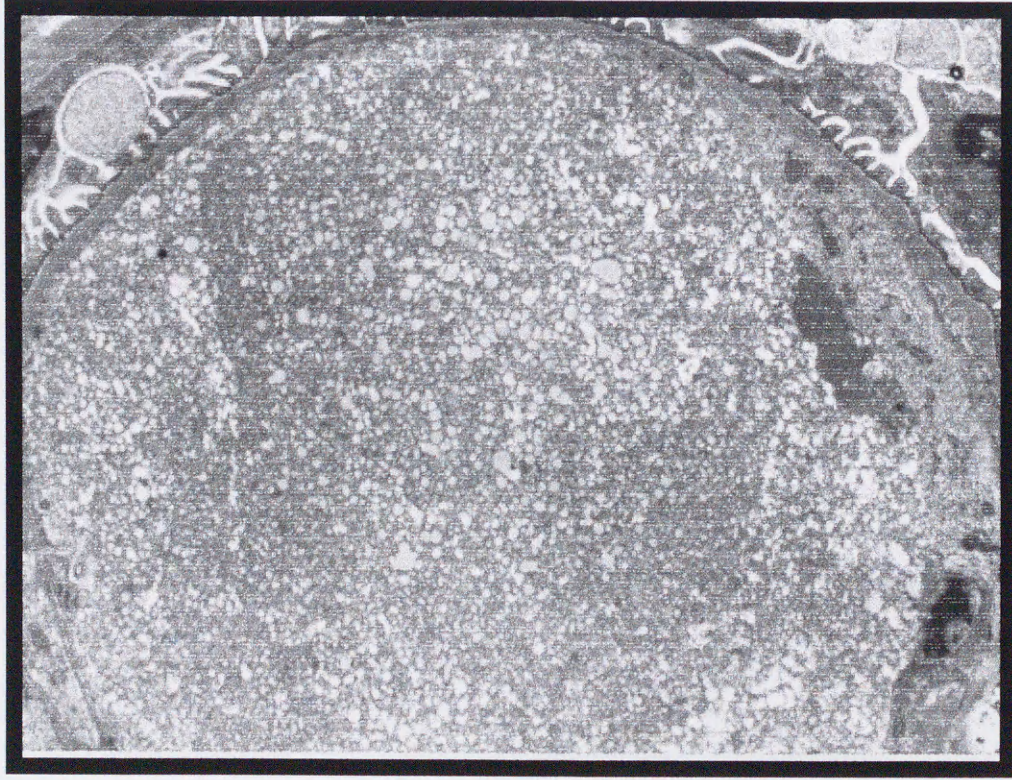
**Fig.19 Light microscopy of glomerulus  
Sudan staining magnification 200**



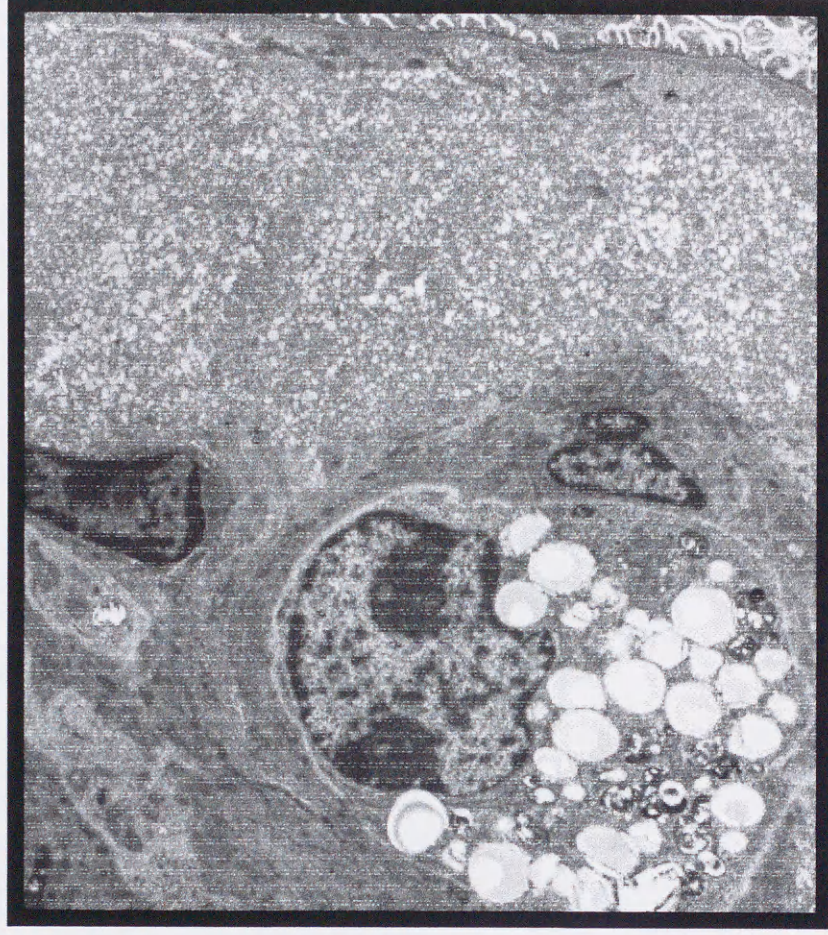


**Fig.20 Light Microscopy of Glomerulus  
ApoE immunostain X 200**





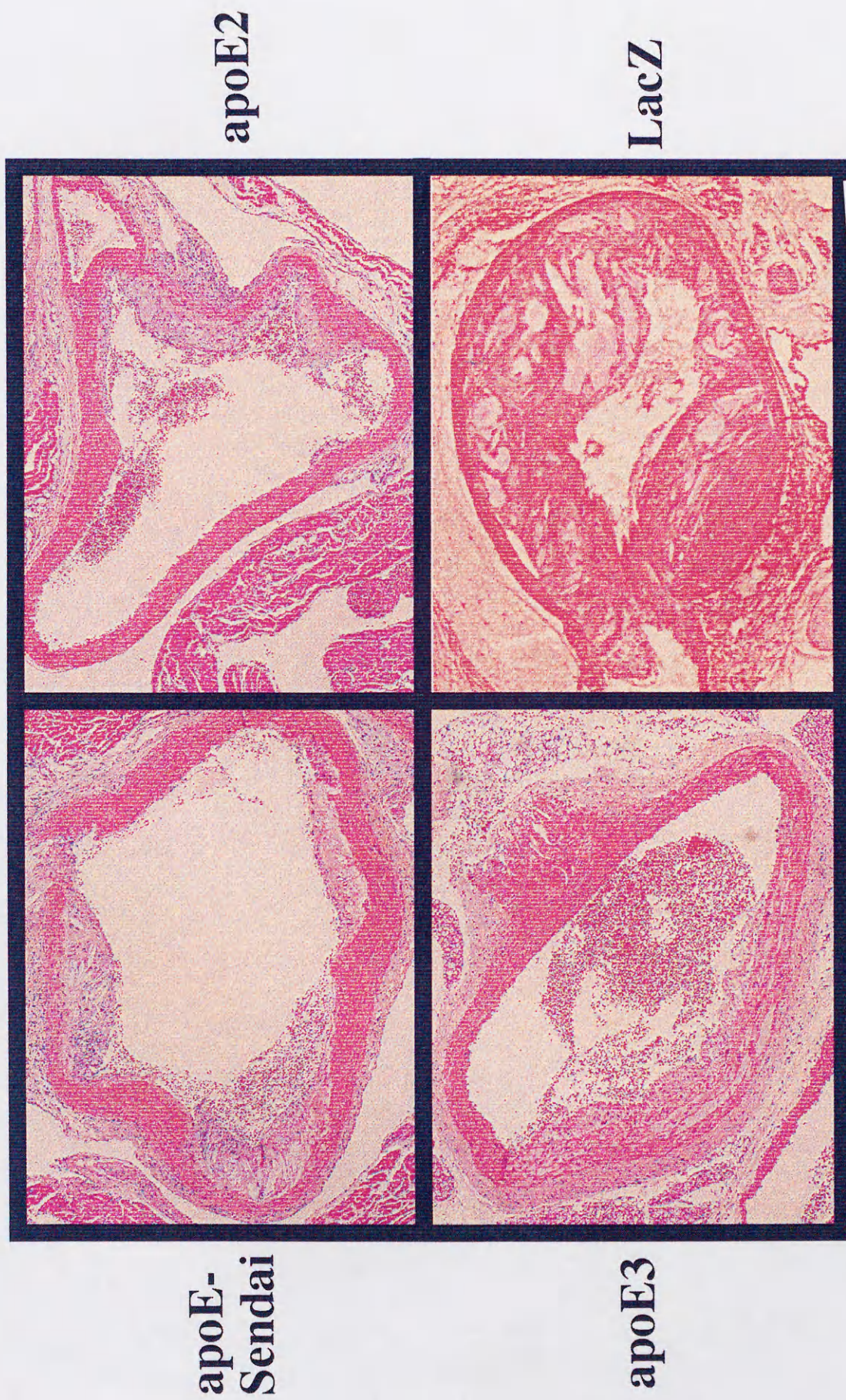
**a. magnification 8000**



**b. magnification 5000**

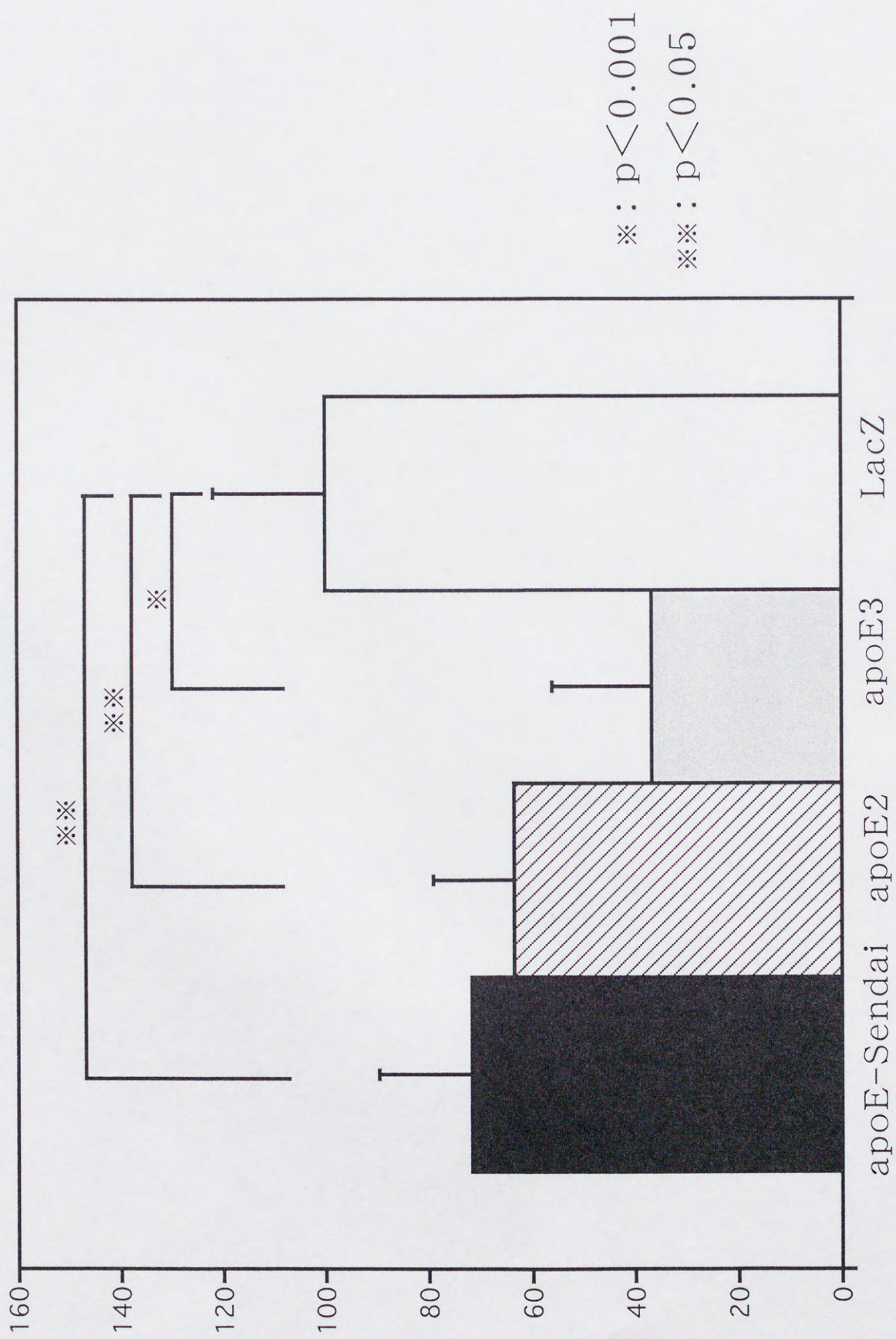
**Fig.21 Electron microscopy of glomerulus**





**Fig.22 Proximal aortic sections from apoE KO mice.  
magnification 40**





**Fig.23 Aortic atherosclerosis after adenoviral infusion**



**LDLR : E3       $K_i = 0.036$  (  $\mu$  g/ml)**

**E-Sendai    $K_i = 0.128$  (  $\mu$  g/ml)**

**VLDLR : E3       $K_i = 0.082$  (  $\mu$  g/ml)**

**E-Sendai    $K_i = 0.136$  (  $\mu$  g/ml)**

$$K_i = EC_{50} / \{ 1 + ( [ L ] / K_D ) \}$$

$EC_{50}$  = effective concentration for 50 % inhibition

$[ L ]$  = concentration of Dil labeled ligand

$K_D$  = dissociation constant

**Table.1       $K_i$  values**



